

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Análisis de la expresión génica diferencial de células
eritroleucémicas resistentes a la diferenciación: relevancia de
las proteínas del citoesqueleto de actina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Vanessa Fernández Calleja

Directora

Dora B. Krimer

Madrid, 2018



Universidad Complutense de Madrid
Centro de Investigaciones Biológicas



**Análisis de la expresión génica
diferencial de células eritroleucémicas
resistentes a la diferenciación: relevancia de
las proteínas del citoesqueleto de actina**

Memoria presentada por Vanessa Fernández Calleja para optar
al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la
Universidad Complutense de Madrid
Madrid, 2017

La presente tesis doctoral titulada “Análisis de la expresión génica diferencial en células eritroleucémicas resistentes a la diferenciación: relevancia de las proteínas del citoesqueleto de actina” ha sido realizada por Vanessa Fernández Calleja, bajo la dirección de la Dra. Dora B. Krimer Smunis, en el Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B.) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.).

Vanessa Fernández Calleja
para optar al título de Doctor

VºBº del Director de Tesis
Dra. Dora B. Krimer Smunis

A mis padres, Luis y M^a José

A mis hermanos, Itziar y Luis

“No vayas donde guía el camino, ve donde no hay camino y deja un rastro”

Ralph Waldo Emerson

Agradecimientos

Aún no he asimilado que después de haber recorrido un largo y duro camino me encuentre escribiendo los agradecimientos de mi tesis. ¿Quién me iba a decir que unas prácticas de máster acabarían en una tesis doctoral?

En primer lugar quiero dar las gracias a la Dra. Débora Krimer por haber confiado en mí y darme la oportunidad de hacer la tesis doctoral en su laboratorio. Agradecerle su ayuda y consejos durante estos años. Quiero agradecer también a los Dres. Bernardo Schwartzman y Pablo Hernández su interés y aportaciones a mi trabajo.

Gracias a la gente con la que he coincidido en el CIB, sin su ayuda este trabajo hubiera sido imposible. Marisa, aunque coincidimos poco tiempo, eres una persona que transmite energía y positivismo, gracias por enseñarnos tan buenos hábitos en el laboratorio y por tu buen humor. Jorge, cuando llegué al laboratorio fuiste una de las personas que más me ayudó. Gracias por estar dispuesto siempre a echar una mano y tomarte tanto interés. Estoy segura de que te va a ir todo bien, en Bostón, en España o donde sea. Eres el ejemplo de que trabajando se puede llegar donde se quiera. Ali, creo que parte de esta tesis es gracias a ti. Gracias por haberme ayudado tanto y animarme para seguir adelante en algunos momentos. Gracias por haber sido mi apoyo en el laboratorio, especialmente en la última etapa. Espero que tengas toda la suerte del mundo en el futuro porque te mereces lo mejor, de verdad. Leo, gracias por los momentos de risas contando anécdotas en las comidas, por aguantarme y por dar tan buenos consejos. Gracias a Eva y Cris por ayudarme con los experimentos siempre que lo he necesitado, por tener tanta paciencia y buen humor.

Gracias a todas las personas que forman parte del CIB y que han hecho posible que esta tesis saliera adelante. Quiero agradecer especialmente su ayuda a Tamar del Servicio de Proteómica y Genómica, Carmen y Zahira del Servicio de Cultivos Celulares, Maite, Gema y Lorena del Servicio de Microscopía Láser y Confocal, Lola y Haydée del Servicio de Bioinformática y Bioestadística y Pedro del Servicio de Citometría de Flujo.

Gracias a Jesús por echarme una mano con el análisis de los datos de las PCR cuantitativas y a Eduardo con los mapas de calor del ARN-seq. Gracias a Dani por su enorme esfuerzo, interés y ayuda con los experimentos de análisis de la polimerización de actina.

Me gustaría agradecer a David Santamaría y al Servicio de Citometría de Flujo del CNIO, en especial a Lola, por facilitarme tanto los experimentos de *cell sorting*.

Gracias a todos los que formáis parte de “la familia que se elige”, creo que no he podido rodearme de mejores personas, sin vosotros no habría llegado hasta aquí. Gracias por apoyarme, animarme y preocuparos por mí. Gracias por haber estado, estar y seguro que estaréis a mi lado.

Gracias a mis tres fantásticos: Carlos, Nerea y Jota ¡Ay!¿qué haría yo sin vosotros?! Carlos, nunca podré agradecerte todo lo que haces por mí. Gracias por estar ahí siempre, por ser como eres y por tener un corazón tan grande. Nerea, gracias por ser mi compañera de prácticas y clases en la universidad, de viajes, de clases mortales en el gimnasio...Gracias por todos los momentos juntas. Jota, sabes que soy muy fan de tus comentarios y chascarrillos. Gracias por ser una persona con la que poder hablar y por tener ese punto de locura cuerda. Estefanía, gracias por ser tan buena persona, por ser mi apoyo, por preocuparte tanto y demostrar cada día que eres una verdadera amiga. Gracias por poder confiar en ti, por

escucharme, comprenderme y dar buenos consejos. Marta, gracias por los buenos momentos que hemos pasado juntas, en tu fiesta de flamenca en Riaza, en Estrasburgo... ¡En breve serás la próxima doctora del grupo! Te deseo toda la suerte del mundo. Maite, si la risa alarga la vida gracias por haberme regalado unos cuantos años. Ya sabes que si en esto de la ciencia no te va bien yo te veo futuro como monologuista. Gonzalo, no se puede ser mejor persona que tú. Aunque ahora lo ves difícil y estás pasando por la peor parte del camino, sé que vas a conseguir sacar tu tesis adelante, tú puedes con esto y más. Te mereces lo mejor. María, aunque nos conocemos desde hace menos tiempo, ha sido suficiente para saber que eres una persona de las que merece la pena tener como amiga. Gracias por ser tan echada para adelante y apuntarte a todo. Joana ¿qué puedo decirte después de tantos años!? Gracias por ser una buena amiga, por haber estado en los días más importantes junto a mí, por estar pendiente, por entenderme y darme un empujoncito cuando más lo necesito. Gracias por ser uno de mis apoyos fundamentales.

Por último, gracias a mi familia, sin vosotros nunca habría llegado hasta aquí. Gracias a mis padres Luis y M^a José, por apoyarme en todo lo que hago, por esforzarse en que todo salga para adelante, por inculcarnos buenos valores y por quererme. Quiero agradecer especialmente a mi madre su tesón, su sentido del humor y ser el espejo en el que mirarse. Gracias a mis hermanos Itziar y Luis, ¡mis gemelares! Gracias por ser tan luchadores, por hacerme reír tanto, por ser tan buenas personas, por tener un corazón enorme y por estar a mi lado.

Gracias a todas y cada una de las personas que comparten buenos momentos conmigo y que me hacen feliz.

Índice

Agradecimientos	
Abreviaturas	
Summary	1
Resumen	4
1. Introducción	8
Introducción	9
1.1. Hematopoyesis. Eritropoyesis	10
1.2. Dinámica de la diferenciación celular en el linaje eritropoyético	12
1.3. Niveles de regulación de la expresión génica	13
1.3.1. Factores de transcripción en células eritroides	13
1.3.2. Cambios en la conformación de la cromatina	14
1.3.3. Cambios epigenéticos. Metilación del ADN	16
1.4. Células Friend como modelo experimental <i>in vitro</i>	17
1.5. Resistencia de las células a las terapias antitumorales	19
1.6. Características del citoesqueleto de actina	20
1.7. Vías de polimerización de filamentos de actina	21
1.8. Características y funciones de Was	22
1.9. Características y funciones de Btk	25
1.10. Características y funciones de la pleckstrina	27
2. Objetivos	30
3. Materiales y métodos	32
3.1. Cultivos celulares	33
3.1.1. Líneas celulares	33
3.1.2. Condiciones de los cultivos	33
3.1.3. Tratamiento con inductores de la diferenciación	33
3.1.4. Ensayo de benzidina	34
3.1.5. Cinética de crecimiento	34
3.1.6. Determinación del tamaño celular mediante citometría	

de flujo	34
3.1.7. Análisis del ciclo celular	35
3.2. Preparación y análisis de ARN	35
3.2.1. Extracción y análisis de ARN	35
3.2.2. Análisis de la expresión génica mediante ARN-seq	36
3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	36
3.3.1. Síntesis de ADNc, RT-PCR	36
3.3.2. Amplificación y análisis por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	37
3.3.3. Cuantificación de la expresión génica relativa mediante PCR a tiempo real	38
3.4. Caracterización de la metilación de los promotores mediante conversión con bisulfito y secuenciación	39
3.5. Preparación y análisis de proteínas	40
3.5.1. Caracterización de la expresión de la proteína HP1 α mediante citometría de flujo	40
3.5.2. Inmunocitoquímica	40
3.5.3. Inmunodetección de proteínas	41
3.5.4. Separación de la conformación monomérica y filamentosa de la actina	42
3.6. Transfecciones	43
3.6.1. Transfecciones con cationes lipídicos	43
3.6.2. Transfecciones estables derivados de MEL-R	43
3.6.3. Transfecciones para generar deleciones en la línea celular MEL-DS19 mediante el sistema CRISPR/Cas9	44
4. Resultados	48
4.1 Caracterización de las líneas celulares MEL-DS19 y MEL-R	49
4.1.1. Características de la diferenciación celular en la línea MEL-DS19	49
4.1.2. Características fenotípicas de las células resistentes a la diferenciación	50
4.1.3. Análisis de los niveles de HP1 α en MEL-R	51
4.1.4. Estudio de la ploidía en células resistentes a la diferenciación	53
4.2. Expresión génica diferencial en MEL-DS19 y MEL-R	55

4.2.1. Análisis de la expresión génica diferencial en MEL-DS19 y MEL-R mediante ARN-seq	55
4.2.2. Genes con mayor transcripción en MEL-DS19 respecto a MEL-R. Genes de citoesqueleto de actina	57
4.2.3. Expresión y organización de la actina en células eritroleucémicas	60
4.2.4. Genes con mayor transcripción en MEL-R respecto a MEL-DS19. Genes de histonas	62
4.2.5. Silenciamiento génico mediado por la metilación de los promotores en células resistentes	64
4.3. Estudio de proteínas implicadas en el citoesqueleto de actina: Was, Plek y Btk	68
Caracterización de Was en células eritroleucémicas	71
4.3.1. Expresión de Was en la línea celular MEL-R	71
4.3.2. La expresión de Was induce la reorganización del citoesqueleto de actina en MEL-R	73
4.3.3. Deleción de <i>Was</i> en células MEL-DS19 basado en el sistema CRISPR/Cas9	75
4.3.4. Efecto de la inhibición de Was sobre el citoesqueleto de actina en células MEL-DS19	79
4.3.5. Función de Was como regulador de la transcripción	81
Caracterización de Btk en células eritroleucémicas	82
4.3.6. Expresión de Btk en células MEL-R	82
4.3.7. La expresión ectópica de Btk en MEL-R induce cambios en el citoesqueleto de actina	84
4.3.8. Deleción de <i>Btk</i> en células MEL-DS19 basado en el sistema CRISPR/Cas9	86
4.3.9. Efecto de la deleción de Btk en MEL-DS19 sobre el citoesqueleto de actina	89
4.3.1. Análisis de la expresión de PU.1 y Was en ausencia de Btk	90
Caracterización de la pleckstrina en células eritroleucémicas	91
4.3.11. Expresión de Plek en la línea celular MEL-R	91
4.3.12. La expresión ectópica de Plek no induce una remodelación de la actina en MEL-R	93
4.3.13. Deleción de <i>Plek</i> en células MEL-DS19 basado en el sistema CRISPR/Cas9	95

4.3.14. La ausencia de Plek en MEL-DS19 induce cambios en la polimerización de actina	97
4.3.15. Función de la pleckstrina como regulador transcripcional	98
5. Discusión	100
5.1. MEL-R como modelo para estudios de resistencia a inductores de la diferenciación	101
5.2. La resistencia de las células eritroleucémicas va acompañada de un silenciamiento génico	102
5.3. Histonas en MEL-R ¿sobreexpresión o redundancia?	104
5.4. Citoesqueleto de actina, más que un soporte celular	106
5.5. Was y Brk como reguladores positivos del citoesqueleto de actina	108
5.6. Plek como regulador negativo del citoesqueleto de actina	110
5.7. Was y Plek, reguladores de Btk	111
6. Conclusiones	113
7. Bibliografía	115
8. Anexo	132

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Esquema de la diferenciación de células hematopoyéticas	11
Figura 2. Transformación de progenitores eritroides infectados con el complejo vírico Friend	18
Figura 3. Esquema del proceso de polimerización de actina	21
Figura 4. Organización de los dominios de los componentes de la familia WASP-WAVE e interacciones con otras proteínas	23
Figura 5. Modelo de activación de la proteína Was	24
Figura 6. Estructura de la tirosina quinasa de Bruton (Btk) e interacciones con otras proteínas	26
Figura 7. Estructura de la pleckstrina	28
Figura 8. Vectores empleados para inducir deleciones en el genoma de MEL-DS19 y selección de transfectantes	45
Figura 9. Selección de clones con deleciones bialélicas	46
Figura 10. Dinámica de diferenciación celular inducida por HMBA	49
Figura 11. Cinética de crecimiento y tamaño celular de MEL-DS19 y MEL-R	51
Figura 12. Análisis del estado de la cromatina en MEL-R	53
Figura 13. La tetraploidía es una característica de las células resistentes	55
Figura 14. Expresión génica diferencial entre MEL-DS19 y MEL-R analizada mediante ARN-seq	57
Figura 15. Expresión diferencial de genes con mayor transcripción en la línea parental respecto a la resistente	58
Figura 16. Análisis de la expresión relativa de genes relacionados con el citoesqueleto de actina mediante PCR a tiempo real	60
Figura 17. Organización y polimerización de la actina en MEL-DS19 y MEL-R	62
Figura 18. Aumento de la expresión génica de histonas en células resistentes	64
Figura 19. Hipermetilación de las islas CpG en los promotores de <i>Btk</i> , <i>Was</i> y <i>Plek</i> en MEL-R	65
Figura 20. Aumento de la expresión génica relativa de <i>Dnmt1</i> y <i>Tet3</i> en células resistentes	66
Figura 21. Hipometilación de las islas CpG de los promotores de genes de histonas	68
Figura 22. Ausencia de las proteínas <i>Plek</i> , <i>Was</i> y <i>Btk</i> en MEL-R	69

Figura 23. Inmunolocalización de Btk en MEL-DS19 y MEL-R	70
Figura 24. Expresión ectópica de Was en células resistentes	72
Figura 25. Tamaño celular de transfectantes MEL-R que expresan Was ectópicamente	73
Figura 26. Organización y polimerización de la actina en transfectantes MEL-R que expresan Was de forma ectópica	75
Figura 27. Esquema de la región delecionada del gen <i>Was</i> en MEL-DS19	76
Figura 28. Selección de clones con deleción bialélica de <i>Was</i> en la línea parental MEL-DS19	77
Figura 29. Cinética de crecimiento, diferenciación y tamaño celular en transfectantes <i>Was</i> ^{-/-}	78
Figura 30. La ausencia de Was en MEL-DS19 provoca defectos en la polimerización y organización del citoesqueleto de actina	80
Figura 31. Análisis de la expresión de Btk en clones de deleción o de sobreexpresión de Was	82
Figura 32. Expresión ectópica de Btk en células resistentes	83
Figura 33. Tamaño celular de transfectantes estables de MEL-R que expresan Btk de forma ectópica	84
Figura 34. Organización y polimerización de la actina en clones de MEL-R que expresan Btk ectópicamente	86
Figura 35. Esquema de la región delecionada del gen <i>Btk</i> en MEL-DS19	87
Figura 36. Selección del transfectante 41 de MEL-DS19 con deleción bialélica en <i>Btk</i>	88
Figura 37. Cinética de crecimiento, diferenciación y tamaño celular en MEL/ <i>Btk</i> ^{-/-}	89
Figura 38. La deleción de <i>Btk</i> en MEL-DS19 produce cambios en la polimerización de actina	90
Figura 39. Análisis de la expresión de PU.1 y Was en transfectantes de Btk	91
Figura 40. Expresión ectópica de Plek en células resistentes	92
Figura 41. La expresión ectópica de Plek no induce cambios en el tamaño celular de MEL-R	93
Figura 42. La expresión ectópica de Plek en MEL-R no induce cambios en la organización y polimerización de actina	94
Figura 43. Esquema de la región delecionada del gen <i>Plek</i> en MEL-DS19	95
Figura 44. Selección del clon 77 con la deleción de <i>Plek</i> en células MEL-DS19	96
Figura 45. Cinética de crecimiento, diferenciación y tamaño celular en MEL/ <i>Plek</i> ^{-/-}	97

Figura 46. Análisis del citoesqueleto de actina en MEL/Plek ^{-/-}	98
Figura 47. Análisis de la expresión de Was, PU.1 y Btk en los transfectantes de Plek	99
Figura 48. Esquema de las interacciones de proteínas cuyas funciones están relacionadas con el citoesqueleto de actina	108
Figura 49. Esquema de la red de proteínas implicadas en la polimerización de actina en células eritroleucémicas	112
Tabla I. Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR	38
Tabla II. Oligonucleótidos empleados en el análisis con bisulfito	40
Tabla III. Anticuerpos primarios empleados en diversas técnicas	42
Tabla IV. Secuencias clonadas en el vector pX330	47
Tabla V. Oligonucleótidos empleados en el chequeo de clones CRISPR/Cas9	47

Abreviaturas

ADNc	ADN complementario
AML	Leucemia aguda mieloide
ARNcr	ARN <i>CRISPR</i> targeting
ARNm	ARN mensajero
ARNsg	ARN <i>single guide</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATRA	Ácido retinoico
BFU-E	<i>Burst forming unit-erythroid</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
Cas	<i>CRISPR Associate protein</i>
CFU-E	<i>Colony forming unit-erythroid</i>
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat</i>
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbeco
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dnmt	ADN metiltransferasa
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
Dominio CRIB	Dominio <i>Cdc42 and Rac-interactive binding</i>
Dominio DEP	Dominio <i>Disheveled gene product, Egl-1 and Pleckstrin</i>
Dominio FH	Dominio <i>Formin Homology</i>
Dominio GBD	Dominio <i>GTPase protein Binding</i>
Dominio MBD	Dominio <i>Methyl-CpG-Binding</i>
Dominio PH	Dominio <i>Pleckstrin Homology</i>
Dominio Src	Dominio <i>Src</i>
Dominio TH	Dominio <i>Tec Homology</i>
Dominio TK	Dominio <i>Tyrosine Kinase</i>
Dominio WH1	Dominio <i>WASP-Homology 1</i>
Dominio WH2	Dominio <i>WASP-Homology 2</i>
EKLF	<i>Erythroid Krüppel-like Factor</i>
EPO	Eritropoyetina
EPO-R	Receptor de eritropoyetina
F-MuLV	<i>Friend Murine Leukemia Virus</i>
FPKM	<i>Fragments per Kilobase of transcript per Million Mapped Fragments</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GMP	<i>Granulocyte-macrophage Progenitor</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HMBA	N,N'-Hexametilen-bis-acetamida
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
MEL	<i>Murine erythroleukemia</i>
MEL-R	<i>Murine erythroleukemia resistente</i>

MEP	<i>Megakaryocyte-erythroid Progenitor</i>
MPP	<i>Multipotential Progenitor</i>
NPF	<i>Nucleation-promoting factor</i>
NSG	<i>Next Generation Sequencing</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PIP	Fosfatidil inositol fosfato
PKC	Proteína quinasa C
Plek	Pleckstrina
RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a PCR
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SFFV	<i>Spleen Focus Forming Virus</i>
Sfpi1	<i>SFFV proviral integration site-1</i>
TET	<i>Ten-eleven translocation</i>
TFK	<i>Tec Family Kinase</i>
TPO	Trombopoyetina
Wasp	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
Xid	<i>X-linked immunodeficiency</i>
XLA	<i>X-linked agammaglobulinemia</i>

Summary

Friend murine erythroleukemia cells (MEL) derive from erythroblasts transformed with the Spleen Focus Forming Virus (SFFV) where integration occurred several kilobases upstream the PU.1 locus (Friend et al. 1966; Ruscetti 1999). These cells remain in proliferative state and do not differentiate in the presence of erythropoietin. MEL-DS19 cells may overcome the blockage, however, and reinitiate differentiation when exposed to a number of different chemical agents, such as hexamethylene-bis-acetamide (HMBA). This feature makes MEL-DS19 cells an extremely useful model to study reprogramming of tumor cells to a non-malignant phenotype and to analyze the mode of action of different chemotherapeutic compounds. We previously reported the establishment of hexamethylene-bis-acetamide (HMBA)-resistant cell lines (MEL-R) that are unable to differentiate, even in the presence of the inducer (Fernandez-Nestosa et al. 2008).

On the other hand, the network of actin filaments provides mechanical support to the cell cytoskeleton, but it is increasingly acknowledged that it also contributes to other critical cellular processes. Emerging evidence points to a role for the actin cytoskeleton in controlling and regulating receptor signaling (Mattila et al. 2016). In this line, changes in the regulation of actin cytoskeleton could be implicated in the blockade of the erythroid differentiation program.

The aims of this thesis were:

- Identify genes whose differential expression is higher in MEL-DS19 in relation to MEL-R, and viceversa by using RNA-seq.
- Analyze specific hematopoietic-genes whose functions are related to the organization and polymerization of the actin cytoskeleton, i.e. *Was* (*Wiskott-Aldrich syndrome*), *Btk* (Bruton's tyrosine kinase) and *Plek* (pleckstrin).
- Generate genomic deletions of *Was*, *Btk* and *Plek* in MEL-DS19 cells via CRISPR/Cas9.
- Established MEL-R transfectants that overexpressed those same genes.
- Analyze the possible implication of increased expression of histone-encoding genes in the resistant line MEL-R.

Resistant cells (MEL-R) showed phenotypic differences in relation to the parental cell line. We corroborated a significant increase in the size of MEL-R cells that parallel a prolonging doubling time.

The distribution of MEL-R cells along the cell cycle follows the same pattern observed in uninduced MEL-DS19 cells. However, we found that the DNA content in the resistant lines has doubled, generating tetraploid cells. This data supports the idea that tetraploid cells enhance tumorigenic capacity relative to diploid cells.

In an attempt to identify genes related to the resistant phenotype we used high-throughput RNA sequencing (RNA-seq) to compare the transcriptomes of the erythroleukemia progenitor and the resistance cell lines. RNA-seq revealed a total of 596 genes that were differentially expressed by more than two-fold, of which 486 genes were up-regulated in MEL-DS19 cells and 110 in MEL-R cells, revealing that the number of genes expressed in the parental cell line decreased as the cells acquired the resistant phenotype.

The progressive gene silencing observed in MEL-R cells involves several mechanisms. We proved that heterochromatinization, a marker for transcription down-regulation, is enhanced in MEL-R cells relative to undifferentiated MEL-DS19 cells, but is nevertheless lower than in HMBA-differentiated cells. We also examined the methylation status of *Was*, *Btk* and *Plek* genes and found that in MEL-R cells the CpG islands remained methylated in contrast to their non-methylated status in MEL-DS19 and HMBA-differentiated cells. The expression pattern of enzymes that catalyze DNA methylation and demethylation revealed an up-regulation of Dnmt1 and Tet3 expression in MEL-R cells. These results showed that the increase in DNA methylation by Dnmt1 in MEL-R cells overlaps with a decrease in demethylation by Tet3, which presumably results in the silencing of gene promoters.

Among the genes differentially expressed in the resistant cells a large proportion belong to histone coding genes. A similar expression pattern was observed in differentiated cells, indicating that differentiated and resistant cells share a common mechanism throughout the differentiation process.

A group of highly up-regulated sequences in MEL-DS19 cells corresponds to genes encoding actin cytoskeleton regulatory proteins suggesting the participation

of the actin cytoskeleton network in the acquisition of resistance to HMBA. Our analysis strongly indicated that the actin cytoskeleton organization was profoundly depressed in the resistant erythroleukemia cell line and let to hypothesize that proteins of the actin network such as *Btk*, *Was* and *Plek* among others, are essential for such organization.

Wiskott-Aldrich syndrome (*Was*) is a protein expressed exclusively in hematopoietic cells. Functionally, *Was* is a nucleation promoting factor that activate Arp2/3 complex to generate F-actin. Our analysis demonstrated that deletion of *Was* based on CRISPR/Cas9 system in MEL-DS19 induced a strong deregulation of actin polymerization. The parental phenotype was restored by the induction of *Was* expression. On the other hand, in MEL-R cells (whose transcription is silenced) the ectopic expression of *Was* increased the level of F-actin. These data suggest that *Was* is the main regulator of actin polymerization in MEL-DS19 cells.

The study of actin performed in MEL-R cells showed that the ectopic expression of Bruton's tyrosine kinase (whose transcription is silenced) also promotes actin cytoskeletal reorganization. Deletion of *Btk* gene in MEL-DS19 showed a reduction of F-actin level. On the opposite, we provided proofs that deletion of *Plek* in MEL-DS19 cell line promoted actin polymerization. These results suggested that both *Was* and *Btk* have a positive role as actin polymerization regulators in MEL-DS19 cell line.

We also found that ectopic *Was* and *Plek* expression in MEL-R induced *Btk* transcription activation. This result data suggested that both, *Was* and *Plek*, regulate *Btk* gene expression.

Altogether, these results suggest that disturbances of genes involved in the regulation and polymerization of actin cytoskeleton are coupled to a resistant differentiation phenotype.

Resumen

Las células eritroleucémicas Friend (MEL) derivan de eritroblastos transformados con el SFFV (*Spleen Focus Forming Virus*) (Friend et al. 1966) integrado corriente arriba del locus PU.1 (Fernandez-Nestosa et al. 2013). Estas células permanecen en estado proliferativo y no se diferencian en presencia de eritropoyetina. Las células MEL-DS19 pueden superar el bloqueo y reiniciar el programa de diferenciación celular cuando se exponen a compuestos químicos como el hexameten-bis-acetamida (HMBA). Esta característica hace de las células MEL-DS19 un excelente modelo de estudio de la reprogramación de un tumor hacia un fenotipo normal. En un trabajo previo se estableció una línea celular derivada de la misma, MEL-R, que muestra resistencia a la diferenciación incluso en presencia del agente inductor (Fernandez-Nestosa et al. 2008).

La red de filamentos de actina proporciona soporte mecánico al citoesqueleto. Se reconoce además, que contribuye a otros procesos celulares críticos. En los últimos años aumentan las evidencias que indican que el citoesqueleto de actina participa en el control y regulación de rutas de señalización (Mattila et al. 2016). En este sentido, cambios en la regulación del citoesqueleto de actina podrían inducir un bloqueo del programa de diferenciación celular.

Los objetivos de la presente tesis son:

- Identificar genes a través de secuenciación masiva (ARN-seq) cuya expresión diferencial difiera significativamente entre MEL-DS19 y MEL-R, y viceversa.

- Examinar el papel de proteínas específicas del linaje hematopoyético implicadas en la organización y polimerización del citoesqueleto de actina, i.e. *Was* (*Wiskott-Aldrich syndrome*), *Btk* (tirosina quinasa de Bruton) y *Plek* (pleckstrina).

- Establecer transfectantes estables en MEL-DS19 mediante el sistema CRISPR/Cas9 que contengan delecciones en los genes *Was*, *Btk* o *Plek*. Establecer transfectantes estables que sobreexpresen estas proteínas en MEL-R.

- Analizar la posible implicación de un aumento de expresión de los genes que codifican histonas en el linaje resistente MEL-R.

Las células resistentes (MEL-R) presentan diferencias fenotípicas respecto a la línea parental. Se observó que MEL-R aumenta el tamaño celular y el tiempo de duplicación es más prolongado respecto a MEL-DS19.

Se ha examinado además, la distribución de las células durante el ciclo celular. El patrón de MEL-R coincide con MEL-DS19. Sin embargo, hemos observado que las MEL-R duplican su contenido en ADN, generando células tetraploides.

En un intento por identificar genes potencialmente relacionados con el fenotipo resistente realizamos una secuenciación masiva de ARN (ARN-seq) para comparar los transcriptomas de la línea eritroleucémica parental y la línea celular resistente. El ARN-seq reveló un total de 596 genes expresados diferencialmente con un *fold change* mayor de dos, de los cuales 486 genes transcriben con mayor intensidad en MEL-DS19 y 110 en MEL-R. Indicando así, que el número de genes activos en la línea parental disminuye a medida que adquiere un fenotipo resistente.

Con el objeto de determinar la posible causa del silenciamiento generalizado de las células resistentes examinamos los niveles de HP1a, proteína asociada a la heterocromatinización, observándose un aumento en las células MEL-R respecto a las MEL-DS19 indiferenciadas, aunque en menor proporción que las células diferenciadas. Asimismo, el estudio de los niveles de metilación de los promotores de *Was*, *Btk* y *Plek*, observando que en MEL-R las islas CpG permanecen metiladas respecto a las no metiladas de MEL-DS19 y células diferenciadas. Los patrones de expresión de enzimas que catalizan la metilación y demetilación del ADN revelaron un aumento en los niveles de transcripción de la Dnmt1 y Tet3 en células MEL-R. Las células resistentes presentan un silenciamiento génico generalizado promovido por un incremento de la heterocromatina y de la metilación de promotores favorecida por un aumento de la ADN metiltransferasa Dnmt1 y una disminución de la demetilasa Tet3.

Entre los genes expresados diferencialmente en las células resistentes una gran proporción codifican proteínas histonas. La validación de los resultados utilizando PCR a tiempo real incluyendo además muestras de MEL-DS19 y células MEL-DS19 diferenciadas mostraron un patrón similar indicando que las células

diferenciadas y las resistentes presentan mecanismos comunes implicados en el proceso de diferenciación.

Uno de los grupos con mayor expresión en las células MEL-DS19 corresponde a genes que codifican proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina. Nuestros análisis indicaron que la organización del citoesqueleto de actina está afectada en la línea eritroleucémica resistente comparada con la línea parental. Estos datos permitieron plantear la hipótesis de que proteínas de la red de actina como *Btk*, *Was* y *Plek* entre otros, podrían ser fundamentales para su organización.

Wiskott-Aldrich syndrome (*Was*) es una proteína expresada exclusivamente en células hematopoyéticas. Funcionalmente, *Was* es un factor promotor de la nucleación que activa al complejo Arp2/3 para generar F-actina. Nuestros análisis demostraron que la delección de *Was* basado en el sistema CRISPR/Cas9 en MEL-DS19 induce una profunda desregulación de la polimerización de actina. La inducción de la expresión de *Was* recupera el fenotipo parental. Por otro lado, en células MEL-R (cuya transcripción está silenciada) la expresión ectópica de *Was* aumenta los niveles de F-actina.

Los estudios de la actina realizados en células MEL-R mostraron que la expresión ectópica de la tirosina quinasa de Bruton (cuya transcripción se encuentra silenciada) también promueve cambios en la organización del citoesqueleto. La delección de *Btk* en MEL-DS19 produjo una reducción de los niveles de F-actina. Estos resultados, junto con el análisis de *Was*, sugieren que tanto *Was* como *Btk* tienen un papel como reguladores positivos de la polimerización de actina en la línea celular MEL-DS19. Por el contrario, la delección de *Plek* en la línea celular MEL-DS19 resultó en un aumento de la polimerización de actina.

Nuestros resultados han demostrado además que la expresión de *Was* y *Plek* en MEL-R induce la activación génica de *Btk* indicando que ambas proteínas ejercen un papel en la regulación transcripcional.

En conjunto, estos resultados sugieren que la desregulación de los genes implicados en la modulación y polimerización del citoesqueleto de actina está asociada a la adquisición de un fenotipo resistente a la diferenciación celular.

1. Introducción

Introducción

Los eucariotas superiores requieren una organización espacio-temporal de procesos esenciales tales como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. La coordinación de todos ellos es necesaria para el mantenimiento y desarrollo de los organismos pluricelulares. La pérdida de esta coordinación puede llegar a desencadenar el desarrollo de células malignas que generalmente progresan a través del ciclo celular de forma incontrolada y presentan un bloqueo en el proceso de diferenciación y apoptosis (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011).

El estudio del cáncer a nivel molecular se ha centrado en la identificación y caracterización de genes involucrados en la regulación de la proliferación y muerte celular. Sin embargo, en los últimos años ha ido cobrando relevancia el análisis de los mecanismos que provocan el bloqueo de la diferenciación, que en numerosas ocasiones es reversible pudiendo las células retomar el programa de diferenciación en respuesta a diversos agentes químicos inductores. Esta estrategia ha sido la base del desarrollo de las terapias de diferenciación. Un buen ejemplo de reprogramación celular de un tumor lo constituyen las células eritroleucémicas murinas MEL-DS19 cuya diferenciación se puede inducir mediante diversos compuestos como por ejemplo el HMBA (N,N'-Hexameten-bis-acetamida) o el DMSO (dimetilsulfóxido) (Marks and Rifkind 1978). Uno de los objetivos del laboratorio donde se llevó a cabo esta tesis doctoral se centra en la identificación y estudio de factores implicados en el bloqueo de la diferenciación de células eritroleucémicas. Los resultados derivados de este análisis podrían contribuir al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

En la presente tesis se ha estudiado la expresión génica diferencial entre la línea celular eritroleucémica MEL-DS19 y una línea resistente a la diferenciación, MEL-R. Uno de los resultados más notables fue la identificación de genes diferencialmente activos que codifican proteínas cuyas funciones están relacionadas con la organización y polimerización del citoesqueleto de actina. Se ha observado además que varios de estos genes transcriben de forma específica en el tejido hematopoyético y que algunos cuando están mutados en humanos dan lugar a

severas deficiencias hematopoyéticas. Tal es el caso de *Was* (*Wiskott-Aldrich syndrome*), *Btk* (tirosina quinasa de Bruton) y *Plek* (pleckstrina).

1.1. Hematopoyesis. Eritropoyesis.

Las células que forman el tejido sanguíneo presentan diversas funciones especializadas entre las que se encuentran el transporte de oxígeno, la fagocitosis, la coagulación de la sangre y la producción de anticuerpos. Estas células se desarrollan y maduran durante la hematopoyesis. Este es un proceso jerárquico altamente regulado tanto por factores intrínsecos entre los que se incluyen factores de transcripción, citoquinas y hormonas, como extrínsecos, interacciones con las células del estroma y de la matriz extracelular (Ogawa 1993; Dzierzak and Philipsen 2013). Una característica singular de la hematopoyesis es la alta tasa de renovación celular, proceso que tiene lugar a partir de las células madre hematopoyéticas (HSC).

Las HSC se localizan en el saco vitelino, la aorta-gónada-mesofrenos y la placenta en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Posteriormente, se emplazan en el hígado y por último migran a la médula ósea, lugar en el que se encuentran principalmente en el adulto (Lim et al. 2013; MacLean et al. 2016).

Durante la división celular, las HSC dan lugar a una célula hija idéntica y a una célula progenitora multipotente (MPP) cuya capacidad de diferenciación se encuentra comprometida generando los dos grandes linajes hematopoyéticos: mieloide y linfoide (Figura 1). Los progenitores mieloides (CMP) proporcionan a su vez dos tipos de células: los progenitores megacariocito-eritroides (MEP) y los granulocito/monocito (GMP) que maduran finalmente en eritrocitos y megacariocitos (plaquetas) en el caso de las células MEP; y en macrófagos y granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) si se trata de progenitores GMP. Por otro lado, la línea linfoide prosigue la diferenciación celular a partir de precursores linfoides (CLP) generando células B, T y NK progenitoras madurando finalmente en células B, células T y células *natural killer* (Lim et al. 2013; Morceau et al. 2013).

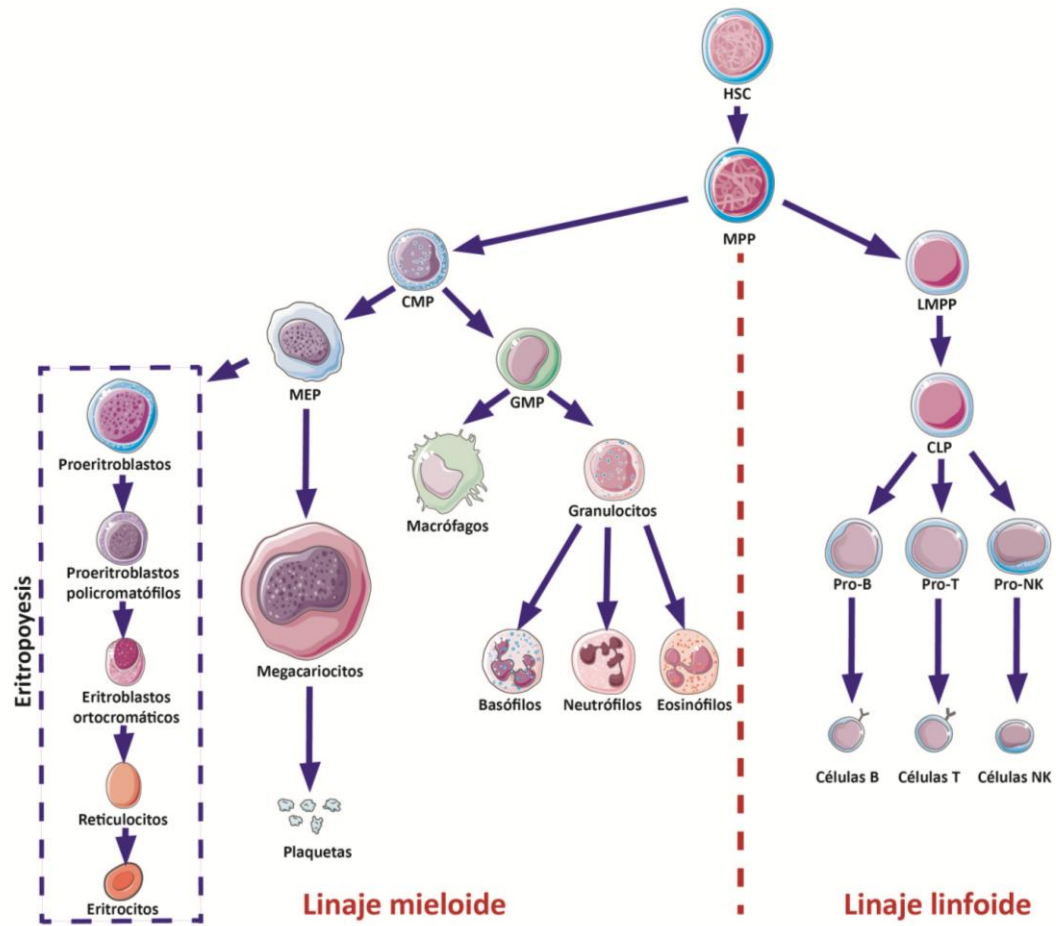


Figura 1. Esquema de la diferenciación de células hematopoyéticas. Las células madre hematopoyéticas (HSC) dan lugar a células multipotentes (MPP) a partir de las cuales se van a formar los dos linajes hematopoyéticos: mieloide y linfoides. Los progenitores mieloides (CMP) generan dos tipos de células: los progenitores megacariocito-eritroides (MEP) y los progenitores granulocito/monocito (GMP). Los MEP maduran finalmente en eritrocitos (mediante el proceso de eritropoyesis) y en megacariocitos que formarán las plaquetas. Los GMP se diferencian en monocitos, macrófagos y granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos). Los precursores linfoides (CLP) generan células B, T y NK progenitoras madurando finalmente en células B, células T y células natural killer.

Los eritrocitos son las células más abundantes del tejido sanguíneo cuya función es el transporte de oxígeno y de dióxido de carbono. La diferenciación de estas células tiene lugar en un proceso específico incluido en la hematopoyesis que se denomina eritropoyesis. Durante la eritropoyesis las células madre hematopoyéticas proliferan y se diferencian en progenitores eritroides: BFU-E (unidades formadoras de brotes eritroides) y CFU-E (unidades formadoras de colonias eritroides). Éstos a su vez dan lugar a los precursores eritroides: proeritroblastos, eritroblastos policromatófilos, eritroblastos ortocromáticos, reticulocitos y finalmente los eritrocitos maduros (Figura 1). Durante la última etapa

de maduración de los reticulocitos de la mayoría de los mamíferos se produce la pérdida-expulsión del núcleo celular.

1.2. Dinámica de la diferenciación celular en el linaje eritropoyético

El proceso de eritropoyesis se encuentra regulado fundamentalmente por la eritropoyetina (EPO), una citoquina cuya síntesis en mamíferos adultos se produce en el riñón en respuesta a la hipoxia tisular. La eritropoyetina es una glicoproteína que controla la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de las BFU-E y CFU-E mediante su unión a los receptores de eritropoyetina (EPO-R). De esta manera se activa la ruta de la tirosina quinasa Jack2 y diversas vías de traducción celular induciendo la proliferación y diferenciación de las CFU-E y previniendo la apoptosis. Otras citocinas implicadas en la eritropoyesis son la interleuquina 3 (IL-3) o la trombopoyetina (TPO) que interactúan con la EPO (Lim et al. 2013).

A lo largo de la eritropoyesis suceden diversos cambios celulares que implican la reducción del tamaño celular, la condensación de la cromatina, la hemoglobinización y la pérdida del retículo endoplasmático y mitocondrias así como del núcleo en el caso de los mamíferos (Dzierzak and Philipsen 2013; Liu et al. 2013b).

La enucleación es un proceso complejo exclusivo de la eritropoyesis de la mayoría de mamíferos en el cual se produce una división asimétrica en la que están involucrados múltiples rutas moleculares y celulares que inducen cambios estructurales y morfológicos. Uno de los principales mecanismos implicados es la condensación gradual de la cromatina promovida en gran medida por las modificaciones de las colas de las histonas, en el cual desempeñan un papel fundamental las histonas deacetilasas (HDACs), en concreto la HDAC2 (Ji et al. 2010). Por otro lado, la síntesis y degradación de las proteínas relacionadas con el citoesqueleto son esenciales para la reorganización celular. Un ejemplo son las Rac GTPasas que activan la formina mDia2 cuya función es formar el anillo de actina contráctil durante la división (Ji et al. 2008). Los microtúbulos por su parte se encargan de la polarización del núcleo para facilitar su eliminación. Otras proteínas implicadas en el proceso son la espectrina, glicoporina A y proteína 4.1 (Ji et al.

2011). En cuanto a los factores de transcripción que participan en el proceso de enucleación, recientemente se ha descrito que EKLF aumenta su expresión en la fase terminal de diferenciación eritropoyética y su ausencia provoca un bloqueo en la eliminación del núcleo (Gnanapragasam et al. 2016).

1.3. Niveles de regulación de la expresión génica

Las células de un organismo pluricelular poseen la misma secuencia de ADN, pero difieren en su desarrollo y funcionalidad en parte debido a una expresión génica diferencial. La modulación de la actividad transcripcional ocurre a distintos niveles. Los factores de transcripción, tanto generales como linaje específicos, son a nivel molecular los más reconocidos como reguladores génicos. Actualmente se reconocen niveles de regulación adicionales que conciernen a la conformación de la cromatina o a factores epigenéticos como la metilación del ADN o la modificación de histonas que son igualmente importantes (Bing Li 2007).

1.3.1. Factores de transcripción en células eritroides

Durante la hematopoyesis, la maduración de células eritroides y megacariocitos a partir de progenitores MEP requieren una regulación coordinada y precisa de diferentes factores específicos entre los que se incluyen GATA-1, EKLF y factores de transcripción de la familia ETS como PU.1 (Crispino 2011). La ausencia de GATA-1 impide avanzar en la eritropoyesis más allá del estadio de proeritroblasto, siendo una proteína esencial para la diferenciación de eritrocitos (Pevny et al. 1995).

PU.1 es otro factor de transcripción fundamental en el proceso hematopoyético que interacciona con proteínas remodeladoras de la cromatina, ADN metiltransferasas y otros factores de transcripción (van Riel and Rosenbauer 2014). Su expresión es indispensable para la diferenciación de granulocitos, monocitos y linfocitos B, mientras que su silenciamiento es obligado para la maduración de eritrocitos. Esta dualidad ha llevado a describir PU.1 como un supresor de tumores en los linajes mieloide y linfoide y como un oncogen en el eritroide (Crispino 2011).

Numerosos estudios han demostrado que PU.1 y GATA-1 actúan de forma antagónica en el linaje mieloide y eritroide en función del ratio relativo de ambas proteínas. La regulación negativa de estos factores ocurre por la interacción física entre los dominios de zinc del C-terminal de GATA-1 con el dominio Ets de PU.1 (Rekhtman et al. 1999; Nerlov et al. 2000; Stopka et al. 2005).

1.3.2. Cambios en la conformación de la cromatina

La identificación y caracterización de factores de transcripción específicos ha generado importantes avances en el estudio del proceso de diferenciación celular (Keller 2005). Sin embargo, actualmente se admite que la regulación mediada por estas proteínas se procesa de forma paralela a otros niveles de regulación. La remodelación de la cromatina, que implica cambios morfológicos y estructurales, desempeña un papel esencial en el establecimiento de patrones de expresión específicos para distintos tipos celulares (Bing Li 2007; Chen et al. 2013).

La estructura de la cromatina es dinámica pudiendo existir distintos estadios funcionales que generalmente coinciden con el nivel de actividad transcripcional. Según el grado de compactación se distingue la eucromatina, región de menor empaquetamiento, rica en genes, y con frecuencia, transcripcionalmente activa y la heterocromatina, región más compacta transcripcionalmente inactiva (Muramatsu et al. 2013).

El proceso de heterocromatización tiene lugar a partir de una cascada de modificaciones de la cromatina. Uno de los principales componentes es la proteína HP1. En mamíferos existen tres isoformas (HP1 α , HP1 β y HP1 γ) implicadas en funciones esenciales para la célula como el silenciamiento génico, regulación de procesos biológicos, segregación de los cromosomas o reparación del ADN (Hiragami-Hamada et al. 2011). A pesar de que la HP1 α se asocia mayoritariamente a regiones de silenciamiento génico, en los últimos años han aumentado las evidencias que indican que también puede promover la transcripción. Esta doble función de la proteína se debe a su versatilidad de unión a diferentes factores.

En la mayoría de los eucariotas las zonas heterocromáticas dependen de los niveles de acetilación de las histonas y de la di- o trimetilación de la H3K9 cuyo

proceso está facilitado por la proteína HP1 α que reconoce la metilación de la lisina 9 y recluta a otras enzimas (Eissenberg and Elgin 2014).

La unidad estructural y funcional de la cromatina es el nucleosoma compuesto de un octámero de histonas y ADN (Buschbeck et al. 2009; Happel and Doenecke 2009; Barrero et al. 2013). El *core* de histonas consta de dos copias de H2A, H2B, H3 y H4 alrededor del cual se unen 147 pares de bases del ADN (1,7 vueltas). Los nucleosomas a su vez se asocian a la histona H1 que actúa como *linker* (Happel and Doenecke 2009; Reuter et al. 2011). Estas proteínas pueden clasificarse en histonas de replicación y variantes.

Las histonas de replicación muestran características peculiares que las distingue del resto de genes: se localizan en familias multicopias o *clusters* que en mamíferos son tres (HIST1, HIST2 e HIST3); transcriben durante la fase S del ciclo celular, carecen de intrones y el extremo 3' del ARN mensajero acaba en una estructura en forma de lazo o *stem loop* en lugar de una cola de poli A (Marzluff et al. 2002; Rattray and Muller 2012).

Por otro lado, las histonas variantes representan una pequeña parte del total de histonas con miembros en todas las familias a excepción de la H4 (Li and Fang 2015). Se caracterizan por presentar una o un bajo número de copias en el genoma, su expresión no depende de la replicación del ADN pudiendo ser temporal y específica de tejido, y el ARNm contiene el típico extremo 3' poliadenilado (Chen et al. 2013; Skene and Henikoff 2013).

Las histonas variantes reemplazan a las de replicación incorporándose a los nucleosomas y provocando cambios en la estructura de la cromatina. Entre sus funciones se encuentran la regulación del proceso de transcripción, replicación o recombinación. Se ha comprobado que el funcionamiento incorrecto de algunas de estas histonas contribuyen al inicio y progresión de un proceso tumoral (Brown 2001; Chen et al. 2013; Vardabasso et al. 2013). Un ejemplo de ello es la H2A.X cuya insuficiencia en ratones aumenta la inestabilidad genómica y la incidencia de tumores. Se ha detectado que las deleciones en el cromosoma 11q23, donde se localiza el gen en humanos, se encuentran presentes con alta frecuencia en diferentes tipos de cáncer como la leucemia linfocítica crónica B-CLL y la leucemia

prolinfocítica T-PLL. Los avances en la secuenciación de alta resolución han dado a conocer mutaciones en otra histona variante H3.3, presentes en el glioblastoma GBD y el glioma DIPG (Vardabasso et al. 2014).

1.3.3. Cambios epigenéticos. Metilación del ADN

En mamíferos, la metilación/demetilación de las citosinas de las islas CpGs del ADN constituye una marca epigenética esencial en la regulación de la expresión génica. El silenciamiento transcripcional se produce mediante dos mecanismos: interfiriendo en la unión de factores de transcripción y provocando cambios en la conformación de la cromatina (Weber et al. 2007; Reddington et al. 2013). Las alteraciones producidas en el patrón de metilación del ADN pueden desencadenar el desarrollo de diversas enfermedades (Baylin 2005; Plass et al. 2013).

El patrón de metilación del ADN varía entre los diferentes tejidos y durante el proceso de diferenciación celular (Reddington et al. 2013). Se ha visto que durante la eritropoyesis de ratones se desencadena una demetilación generalizada del ADN llegando a perder un tercio de la metilación total del genoma. El restablecimiento de los niveles de metilación se produce por metilaciones *de novo* (Shearstone et al. 2011).

Las enzimas que catalizan la metilación de las citosinas son las ADN metiltransferasas (Dnmt). La Dnmt1 metila preferentemente la hebra naciente, no metilada, durante la replicación del ADN contribuyendo a mantener los patrones de metilación en las células. Las metilasas Dnmt3 por otra parte, catalizan la metilación *de novo* en ambas hebras. El grupo de las Dnmt3 está constituido por dos miembros catalíticamente activos, Dnmt3a y Dnmt3b y otra proteína inactiva, Dnmt3L, cuya función es regular a los otros dos componentes de la familia (Bird 2002; Neri et al. 2013).

La oxidación o demetilación de las citosinas es mediada por las enzimas TET (*ten-eleven translocation*) dando lugar a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC). Esta familia está formada por tres componentes: Tet1, Tet2 y Tet3. En ratón, se encuentran niveles elevados de Tet1 en blastocitos, células germinales primordiales y células madre embrionarias,

mientras que Tet2 y Tet3 se expresan en varios tejidos adultos (Kohli and Zhang 2013; Wu and Zhang 2014). Las mutaciones producidas en Tet2 se encuentran presentes con alta frecuencia en enfermedades mieloides. Los estudios realizados en modelos murinos han demostrado que es una enzima imprescindible en la auto-renovación y diferenciación de células madre hematopoyéticas, cuya desregulación conduce al desarrollo de dichas afecciones. Por tanto, Tet2 actúa como un gen supresor de tumores regulando la metilación del ADN mediante el control epigenético de la transcripción, y su actividad es crítica para impedir el desarrollo de leucemias (Li et al. 2011).

Además de los factores de transcripción, conformación de la cromatina y metilación del ADN, existen otros niveles de regulación génica como por ejemplo la topología del ADN, la expresión de microARNs o las modificaciones post-transcripcionales que quedan fuera del ámbito de este estudio.

1.4. Células Friend como modelo experimental in vitro

La eritroleucemia es un tipo de leucemia mieloide aguda (AML) en la que no se forman eritrocitos maduros debido a un bloqueo en el proceso de diferenciación. Uno de los sistemas mejor caracterizados de reprogramación de células tumorales que permite el estudio *in vitro* de este bloqueo son las células eritroleucémicas Friend.

Las células Friend o células MEL proceden de precursores hematopoyéticos transformados con el complejo vírico Friend (Friend et al. 1966). Este complejo, descubierto por la Dra. Charlotte Friend en el año 1957, está formado por dos retrovirus: el SFFV (*Spleen Focus Forming Virus*) responsable del proceso tumoral, pero defectivo en replicación, y el F-MuLV (*Friend Murine Leukemia Virus*) necesario para la replicación del SFFV (Spiro et al. 1988; Ruscetti 1995).

El complejo vírico Friend induce eritroleucemias cuando se inyecta en cepas de ratones susceptibles (Lee et al. 2003; Moreau-Gachelin 2008). La eritroleucemia transcurre en dos fases (Figura 2). En la primera se activa la expresión del gen *env* del SFFV que codifica la glicoproteína de membrana gp55 e interacciona con el receptor de la eritropoyetina (EpoR) activando las rutas de señalización Jak2-Stat,

Ras/Raf-1/MAPK y PI3K (Muszynski et al. 1998; Nishigaki et al. 2000). La activación del EpoR de forma constitutiva dispara la proliferación masiva de progenitores eritroides (BFU-E y CFU-E) (Spiro et al. 1988; Li et al. 1990). La proteína gp55 promueve una proliferación incontrolada que conduce a una esplenomegalia e hiperplasia masiva (Moreau-Gachelin 2008; Ruscetti 2010)

La segunda fase ocurre en un reducido número de células debido a la integración del SFFV corriente arriba del promotor del gen *PU.1/Sfpi* en los precursores eritroides. La activación de *PU.1* provoca el bloqueo de la diferenciación y la immortalización celular (Moreau-Gachelin et al. 1988).

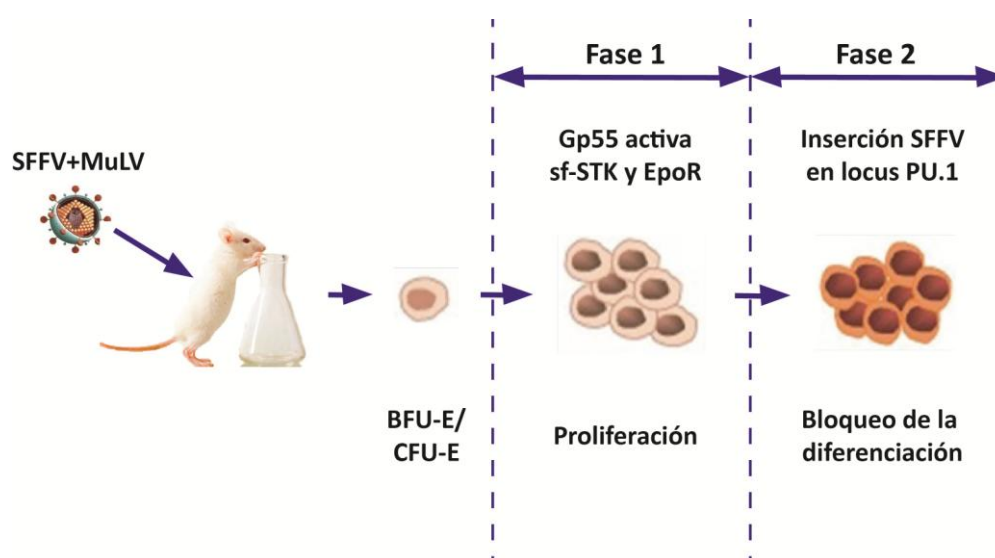


Figura 2. Transformación de progenitores eritroides infectados con el complejo vírico Friend. Fases de la eritroleucemia inducida en ratones por la inyección del SFFV. En la primera fase se produce la expansión de progenitores eritroides BFU-E y CFU-E debido a la activación del EpoR y sf-STK por la proteína viral gp55. La segunda fase ocurre por la inserción del SFFV en el locus *Sfpi-1/ PU.1* que promueve la sobreexpresión de este gen y produce un bloqueo de la diferenciación celular.

Una de las características fundamentales de la línea celular MEL-DS19 que hace de ellas un excelente modelo de estudio *in vitro* es su capacidad de retomar el programa de diferenciación celular (Reuben et al. 1976; Antoniou 1991; Marks et al. 1994). A partir de las 96h de exposición a agentes inductores tales como el HMBA (N,N'-Hexameten-bis-acetamida) o el DMSO (dimetilsulfóxido), aproximadamente el 90% de las células MEL-DS19 se encuentran diferenciadas (Marks and Rifkind 1978; Vanegas et al. 2003). Durante este proceso las células sufren cambios

similares a los que se producen en la maduración eritropoyética: condensación de la cromatina, disminución de la relación núcleo-citoplasma y reducción del tamaño celular (Marks et al. 1994).

A nivel molecular se incrementa la transcripción y traducción de moléculas específicas del linaje eritroide en las que se incluyen las α y β globinas, los factores de transcripción EKLF y GATA-1 e inhibidores del ciclo celular como p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP} y mad1. Por el contrario, se reduce la expresión de genes involucrados en el ciclo celular como las ciclinas dependientes de quinasas *cdk6* y *cdk4*, *c-myc*, *c-myb* o *PU.1*, entre otros (Krimer et al. 1993; Hsieh et al. 2000; Fernandez-Nestosa et al. 2008). El proceso de diferenciación finaliza con una disminución de la proliferación celular y una acumulación de las células en la fase G1 del ciclo celular (Kiyokawa et al. 1993; Vanegas et al. 2003; Fernandez-Nestosa et al. 2008).

De forma paralela se producen cambios en la cromatina tanto a nivel estructural como epigenético. Algunas de estas variaciones se observan en la incorporación de la histona variante H3.3 en el octámero de histonas del nucleosoma o en la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9Ac) (Stopka et al. 2005; Burda et al. 2010).

1.5. Resistencia de las células a las terapias antitumorales

Las células tumorales pueden retomar el programa de diferenciación celular respondiendo a diversos agentes químicos, tal y como se describe en el apartado anterior en la línea celular MEL-DS19. Un ejemplo clínico es el tratamiento de células leucémicas promielocíticas con ácido retinoico (ATRA) que induce la diferenciación celular (Nowak et al. 2009). Otros compuestos como los inhibidores de histonas deacetilasas (HDAC) (Lane and Chabner 2009; Marks and Xu 2009), análogos de la citidina (Fenaux et al. 2010) e inhibidores de las tirosina quinasas (Haouala et al. 2011) son menos efectivos en el tratamiento de leucemias y tumores. Uno de los obstáculos comunes a todas las terapias anti-tumorales es la adquisición y desarrollo de resistencia a los fármacos en respuesta a una exposición continuada del mismo, obligando al uso de tratamientos combinados que conllevan un aumento de la toxicidad (Iland et al. 2012). La aparición de multi-resistencia a

fármacos (MDR) en numerosas ocasiones se ha asociado con la reorganización del citoesqueleto de actina (Desouza et al. 2012). Así, cambios en los filamentos de actina específicos de células tumorales con MDR pueden representar un punto de vulnerabilidad donde dirigir la actuación de nuevos compuestos que aumenten la efectividad de los tratamientos.

Como se ha comentado anteriormente, los cultivos de MEL-DS19 en presencia de agentes inductores de la diferenciación son capaces de alcanzar hasta un 90% de células diferenciadas. Alrededor de un 10% de la población genera resistencia a los compuestos químicos bloqueando la entrada en el programa de diferenciación. A partir de dichas células se estableció en nuestro laboratorio la línea resistente MEL-R (Fernandez-Nestosa et al. 2008). En la presente tesis se llevó a cabo el análisis de la expresión génica diferencial entre células MEL-DS19 y MEL-R utilizando técnicas de secuenciación masiva de ARN. Los resultados más notables indicaron un silenciamiento en las líneas resistentes de genes involucrados en el citoesqueleto de actina, varios de los cuales son específicos del linaje eritroide.

1.6. Características del citoesqueleto de actina

La actina es la proteína más abundante en las células eucariotas constituyendo el 15% del total. Sus funciones están relacionadas con la contracción muscular, morfología celular, movilidad, transporte intracelular, regulación de la actividad enzimática, división celular y enucleación de eritrocitos. Existen varias isoformas de la proteína: α -actina, γ -actina y β -actina. En la presente tesis doctoral la proteína más interesante para su estudio es la β -actina ya que es la más importante en eritrocitos y participa en la polimerización de actina (Khaitlina 2001; Grzanka et al. 2013).

La actina puede encontrarse en las células en una conformación libre monomérica globular (G-actina) o formando un polímero lineal (F-actina). La G-actina puede transformarse en F-actina a través del proceso de polimerización que ocurre en tres etapas (Figura 3): 1) Fase de nucleación, donde la G-actina se une con moléculas de Mg^{2+} y ATP que inducen un cambio conformacional favoreciendo el ensamblaje tres monómeros. 2) Elongación, donde se agregan monómeros de

actina en ambos extremos provocando la hidrólisis del ATP y alargando el filamento hasta alcanzar un equilibrio entre la cantidad de G y F-actina. 3) Fase estacionaria o de equilibrio, en la cual se adicionan y desensamblan monómeros de actina en los extremos del filamento sin provocar un cambio de la masa neta del mismo (Lodish 2005; Nurnberg et al. 2011; Grzanka et al. 2013). Finalmente, la F-actina queda formada por una hélice levógira con 13 moléculas que se repiten cada seis vueltas. Sin embargo, debido a que el giro por molécula se aproxima a los 180° la estructura aparece como dos cadenas que giran hacia la derecha (Dominguez and Holmes 2011).

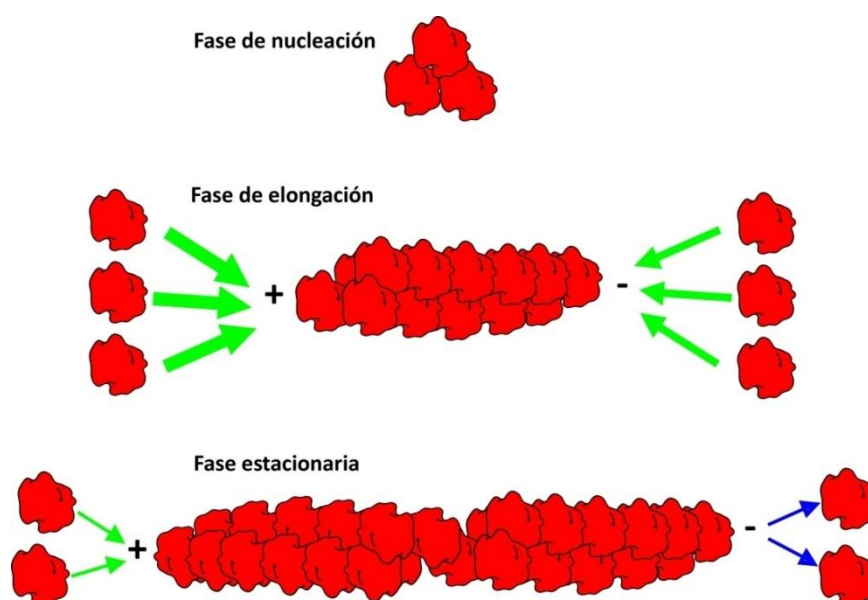


Figura 3. Esquema del proceso de polimerización de actina. Representación esquemática de las fases de la polimerización de actina. En la fase de nucleación se unen tres moléculas de actina. En la elongación se adicionan monómeros de actina por los extremos + y - con una mayor o menor velocidad, respectivamente. En la fase estacionaria se adicionan (flechas verdes) y desensamblan (flechas azules) el mismo número de moléculas de actina.

1.7. Vías de polimerización de filamentos de actina

Se han descrito en células eucariotas cinco mecanismos distintos que pueden llevarse a cabo simultáneamente y actuar de forma sinérgica: complejo Arp2/3, forminas, Spire (Spir), Cordon-bleu (Cobl) o Leiomodin (Lmod). Las rutas de polimerización más conocidas son realizadas a través del complejo Arp2/3 y de las forminas. Sin embargo, Spire y Cordon-bleu muestran un patrón de expresión más

específico, siendo más abundantes por ejemplo en el cerebro, mientras que Lmod se encuentra en el músculo.

La vía de polimerización más conocida es la que realiza el complejo Arp2/3. Dicho complejo está formado por siete proteínas (Arp2, Arp3, ARPC1, ARPC2, ARPC3, ARPC4, y ARPC5) cuya activación depende principalmente de la familia WASP-WAVE. En los últimos años se han descrito otras proteínas NPF (*nucleation-promoting factors*) capaces de unirse al Arp2/3: WASH (Linardopoulou et al. 2007), WHAMM (Campellone et al. 2008) y JMY (Zuchero et al. 2009).

En células hematopoyéticas el principal factor de nucleación de actina es Was que se une al complejo Arp2/3 a través de su dominio WH2. El complejo Arp2/3 activo se asocia a filamentos preexistentes de actina formando un ángulo de 70º para iniciar la polimerización de un nuevo filamento (Le Clainche and Carlier 2008; Campellone and Welch 2010; Rodnick-Smith et al. 2016).

1.8. Características y funciones de Was

Las mutaciones producidas en el gen *Was* tanto en humanos como en modelos murinos generan una inmunodeficiencia recesiva ligada al cromosoma X conocida como *Wiskott-Aldrich syndrome* descrita por primera vez en 1937 por el Dr. Alfred Wiskott (Wiskott 1937) y estudiada posteriormente por el Dr. Robert Aldrich en 1954. Sin embargo, no fue hasta 1994 cuando se aisló el gen *Was* humano (Derry et al. 1994). La enfermedad presenta una sintomatología asociada a trombocitopenia, eczema y aumento del riesgo de infecciones.

Was se localiza mayoritariamente en el citoplasma, aunque puede estar también en el núcleo ejerciendo un papel en la regulación génica independiente de la polimerización de actina (Taylor et al. 2010; Looi et al. 2014; Sadhukhan et al. 2014).

La estructura proteica de Was está compuesta por varios dominios (Figura 4): 1) Dominio WH1 (*WASP-Homology domain 1*) o EVH1 lugar de unión de la familia WIP a través de un dominio rico en prolina. 2) Dominio GBD (*GTPase protein Binding Domain*) o CRIB donde se produce la asociación con la Rho GTPasa cdc42 responsable de la activación de Was. 3) Región rica en prolina donde interacciona

con diversas moléculas a través del dominio SH3 entre las que se incluyen Nck, Btk, VASP o la proteína quinasa Fyn entre otras. 4) Dominio WH2 (*WASP-Homology domain 2*) o VCA, que es el lugar de unión de monómeros de actina (G-actina) y del complejo Arp2/3, responsable del inicio de la polimerización de actina (Caron 2002; Thrasher 2002; Takenawa and Suetsugu 2007; Catucci et al. 2012).

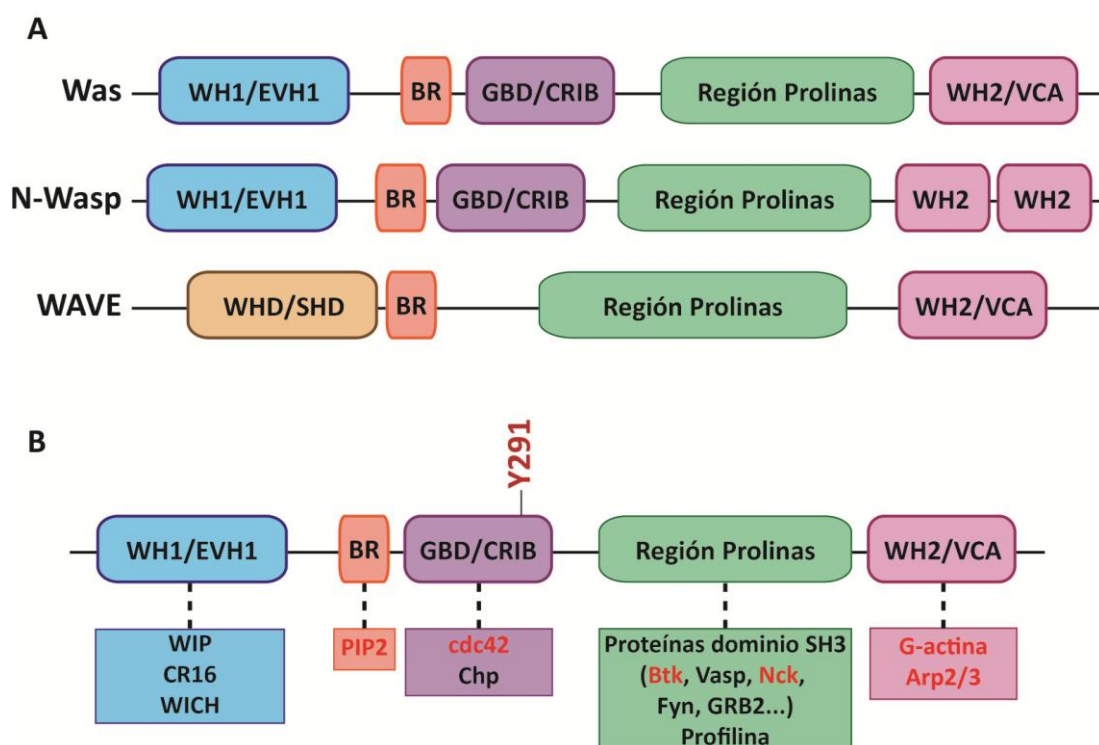


Figura 4. Organización de los dominios de los componentes de la familia WASP-WAVE e interacciones con otras proteínas. A) Estructura de las proteínas de la familia WASP-WAVE. Todas las proteínas poseen una región básica (BR), una zona enriquecida en prolina y un dominio WH2 (VCA). Además, Was y N-Wasp contienen un dominio WH1 (EVH1), cuyo análogo en WAVE1, 2 y 3 es WHD (SHD), y un dominio GBD (CRIB) que se encuentra ausente en las proteínas WAVE. B) Interacciones de los dominios de Was con otras moléculas. Además, se han destacado en rojo algunas de las proteínas más importantes implicadas en la activación de Was como PIP2, cdc42, Btk o Nck, y el inicio de la polimerización de actina (G-actina y Arp2/3). Se muestra también la posición de la tirosina 291 (Y291) en el dominio GBD.

Was y N-Wasp se localizan en el citoplasma en una conformación autoinhibida producida por la unión del dominio WH2 con el N-terminal (incluyendo el dominio GBD y regiones adyacentes) (Figura 5A). Este plegamiento impide el acceso del complejo Arp2/3 al dominio WH2. La activación de Was y N-Wasp se produce principalmente por la asociación competitiva de cdc42 al dominio GBD, y PIP2 (fosfatidil inositol 4,5 bifosfato) en la zona básica de la proteína (Figura 5B y C).

Varios estudios han demostrado que a pesar de que WAVE carece de dominio GBD, podría presentar una conformación autoinhibida similar a la observada en Was cuya activación sería promovida por la unión de Rac y PIP3 (fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato) (Thrasher 2002; Kurisu and Takenawa 2009; Thrasher and Burns 2010; Frugtniet et al. 2015).

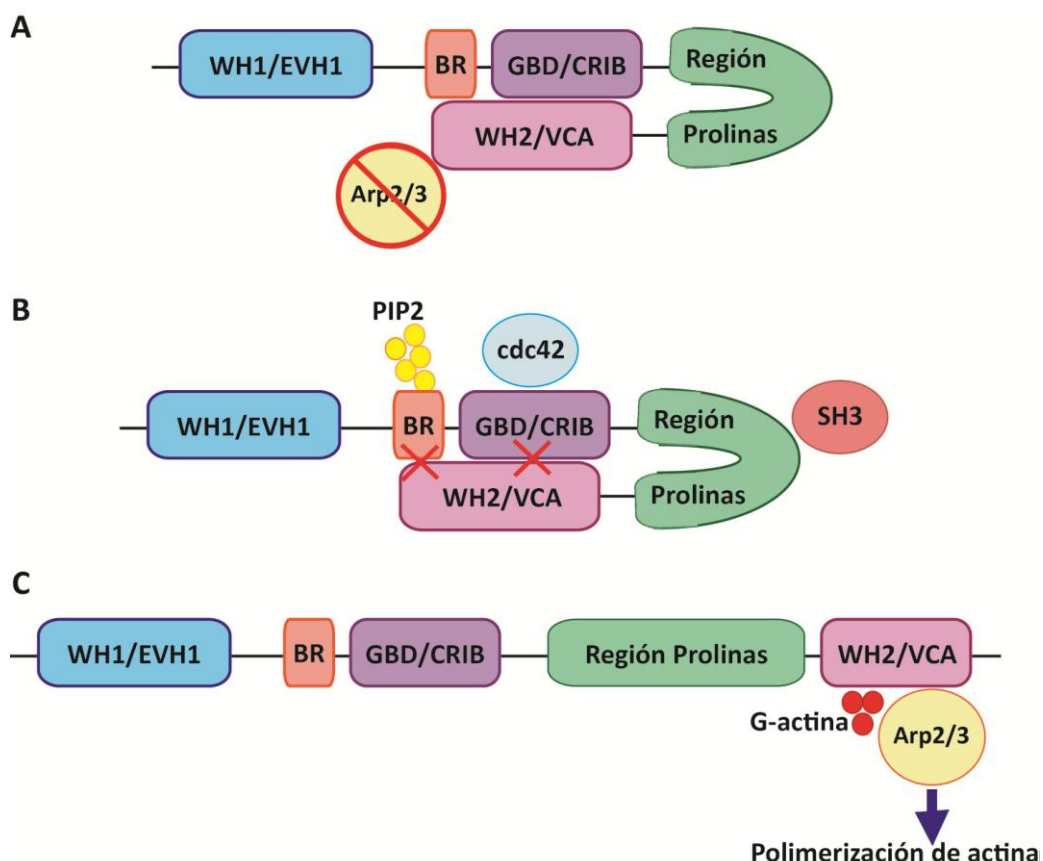


Figura 5. Modelo de activación de la proteína Was. A) La conformación plegada de Was induce su autoinhibición mediante la interacción del dominio WH2 con GBD y BR impidiendo el acceso del complejo Arp2/3 a la región WH2. B) La activación de Was por la unión de PIP2 y cdc42 o por proteínas con dominio SH3 en la región rica en prolina libera las interacciones del dominio WH2 con GBD/BR provocando un cambio conformacional de la proteína. C) La proteína activa es capaz de unir monómeros de actina (G-actina) y el complejo Arp2/3 induciendo la polimerización de filamentos de actina.

Otra vía alternativa de activación de Was depende de la región rica en prolina donde se unen proteínas con un dominio SH3 como es el caso de las Nck y Btk. La regulación de la proteína también se produce a través de la fosforilación de las serinas (S483 y S484 del dominio WH2 constitutivamente y S277 en GBD) y de la tirosina 291 (Y291) del dominio GBD.

Las quinasas pueden actuar en siete residuos de tirosina distintos aunque la fosforilación de la Y291 es crítica y está mediada por la familia Src, FAK, ACK1, Btk y Syk. El efecto que produce la fosforilación es un aumento en la polimerización de actina. Además, numerosos estudios han demostrado que la fosforilación de la tirosina desencadena la degradación de Was a través del proteosoma. Estos datos sugieren que la activación por fosforilación puede producirse de forma transitoria y actuar posteriormente como una señal de inactivación y degradación (Cory et al. 2002; Blundell et al. 2009; Dovas and Cox 2010; Lane et al. 2014).

Se han descrito otros mecanismos de regulación de los niveles de Was como por ejemplo mediante la unión con WIP protegiéndola de su degradación a través del proteosoma o por calpaínas. En un estudio reciente se ha demostrado que la fosforilación de la tirosina de WIP mediada por Btk provoca su desensamblaje de Was y la degradación de ésta (Vijayakumar et al. 2015).

1.9. Características y funciones de Btk

La tirosina quinasa de Bruton (Btk) es una proteína perteneciente a la familia de quinasas Tec (TFK). En 1993 dos grupos de investigación identificaron el gen de *Btk* cuyas mutaciones desencadenaban el desarrollo de una inmunodeficiencia ligada al cromosoma X conocida como XLA (*X-linked agammaglobulinemia*) en humanos o Xid (*X-linked immunodeficiency*) en ratón, caracterizada por la reducción de linfocitos B circulantes y la incapacidad de producir inmunoglobulinas (Tsukada et al. 1993; Vetrie et al. 1993).

Btk se expresa de forma específica en el tejido hematopoyético, a excepción de células T. Su activación depende de PU.1 que se asocia a sitios GGAA del promotor de *Btk* (Himmelmann et al. 1996). Los factores de transcripción Sp1 y Spi-B potencian así mismo la activación de *Btk*, asociándose a una GC-box en el caso de Sp1 o interaccionando con sitios comunes a PU.1 en Spi-B (Muller et al. 1996; Christie et al. 2015).

Btk se localiza mayoritariamente en el citoplasma y en menor proporción en el núcleo. Su estructura comprende varios dominios: PH (*pleckstrin homology*), TH

(*Tec homology*), SH3 (*Src-homology 3*), SH2 (*Src-homology 2*) y TK (*tyrosine kinase*) (Figura 6).

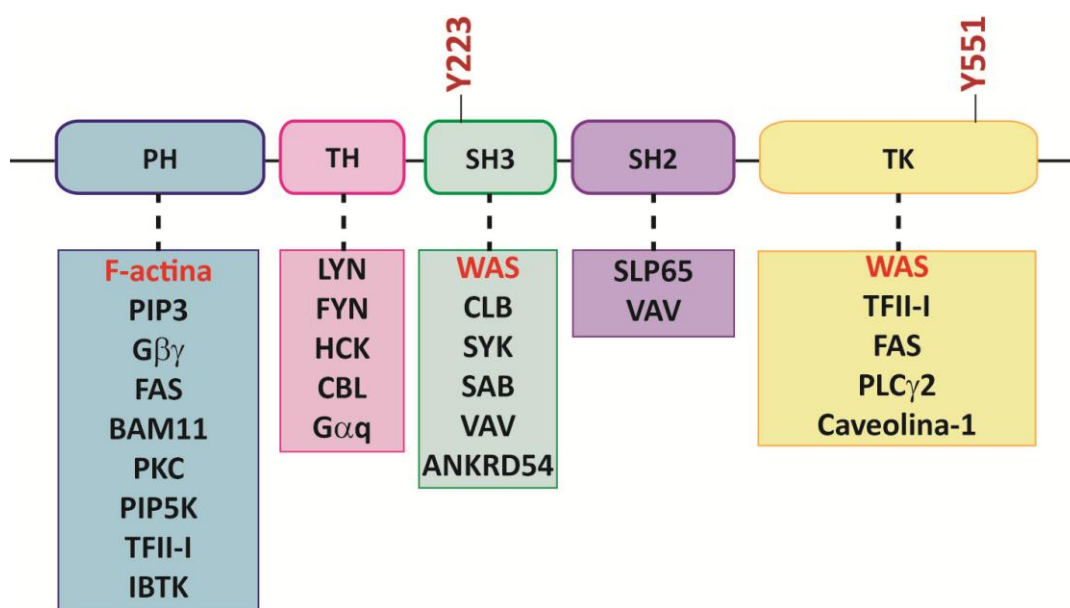


Figura 6. Estructura de la tirosina quinasa de Bruton (Btk) e interacciones con otras proteínas. Btk está formada por 5 dominios que interaccionan con diversas moléculas de señalización como se indica en el esquema. Se han destacado en rojo las proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina de mayor relevancia. Se muestra también, la localización de las tirosinas 223 y 551 (Y223 e Y551) implicadas en la activación de la proteína.

La activación de la proteína tiene lugar a partir de la asociación transitoria con la membrana celular donde se produce la fosforilación de la tirosina 551 (Y551) del dominio TK, catalizado por la familia de quinasas Src o SYK (*spleen tyrosine kinase*). A continuación, se desencadena la actividad catalítica de Btk provocando la autofosforilación de la tirosina 223 (Y223) del dominio SH3. Este proceso está altamente regulado por diversas proteínas de señalización como por ejemplo la proteína quinasa C o la caveolina-1 (Mohamed et al. 2009; Hendriks et al. 2014).

La activación de Btk desencadena una cascada de señalización celular que implica una movilización de calcio, reorganización del citoesqueleto y regulación transcripcional. En células B desempeña funciones esenciales en el desarrollo, diferenciación y señalización.

Estudios realizados en células B de ratón han demostrado que Btk conecta la actividad de la señal de los receptores con el transporte y procesamiento de antígenos movilizándolo el citoesqueleto de actina a través de Was. Para ello, Btk

dispone de diferentes mecanismos: por interacción directa con Was, activando la GTPasa cdc42 mediante Vav que actúa como un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) y aumentando la síntesis de PIP₂ que es un co-activador de Was. Además, Btk promueve la organización del citoesqueleto de actina dependiente de Rac y se ha observado que su dominio PH puede interaccionar directamente con los filamentos de actina (Sharma et al. 2009; Hendriks et al. 2014).

Hay evidencias que demuestran que Btk desempeña un papel importante durante la eritropoyesis ya que es capaz de asociarse a receptores de eritropoyetina (EpoR) y a Jak2, siendo un sustrato de este último. La estimulación tanto de los SCF (*stem cell factor*) como de EpoR, esenciales en el proceso de diferenciación de eritrocitos, produce un aumento en la actividad catalítica de Btk. La ausencia de Btk reduce la fosforilación de los receptores de eritropoyetina, Jak2 y Stat5. Además, los factores SCF promueven la interacción de Btk con los receptores de apoptosis TRAIL-1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). La presencia de Btk evita que haya un aumento de la sensibilidad de las células a la respuesta de apoptosis inducida por TRAIL (Schmidt et al. 2004). Estos datos indican que Btk podría estar implicada en el control de la expansión, supervivencia y diferenciación de progenitores eritroides mediante dos mecanismos: regulando la señal inducida por la eritropoyetina y controlando la apoptosis inducida por TRAIL.

1.10. Características y funciones de la pleckstrina

La pleckstrina fue descrita en 1979 por Haslam y colaboradores (Haslam et al. 1979) y ha sido conocida durante años como el mayor sustrato de la proteína quinasa C (PKC) en plaquetas, denominada inicialmente P47. Posteriormente, se demostró que se expresaba de forma específica en leucocitos y plaquetas, donde representa el 1% del total de proteínas celulares, y comenzó a llamarse pleckstrina (*platelet and leukocyte C kinase substrate*). En el año 2000 se observó la presencia de pleckstrina en células ajenas al tejido hematopoyético (Cmarik et al. 2000).

La pleckstrina es una proteína de 350 aminoácidos que se distribuye por el citoplasma aunque en su forma fosforilada se concentra alrededor de la membrana

plasmática. Su estructura la conforman dos dominios PH (*pleckstrin homology*) separados por un dominio central DEP (*disheveled gene product, egl-1 and pleckstrin*) (Ponting and Bork 1996; Civera et al. 2005). Los dominios PH son capaces de interactuar con fosfatidil inositol y con las subunidades β/γ de proteínas G. Entre el dominio PH del N-terminal y el dominio DEP se encuentran dos residuos de serinas y uno de treonina (S113, S117 y T114) que son fosforilados por la PKC, promoviendo la conformación activa de la proteína (Abrams et al. 1995; Abrams et al. 1996) (Figura 7).

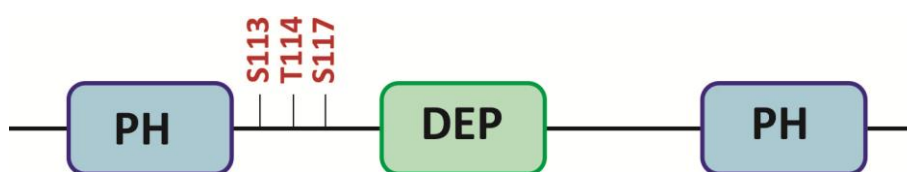


Figura 7. Estructura de la pleckstrina. La proteína la conforman dos dominios PH separados de otro central denominado DEP. Se muestran también la localización de las serinas 113 y 117 (S113 y S117) y de la treonina 114 (T114) cuya fosforilación es necesaria para activar la proteína.

Varios estudios han demostrado que la fosforilación incorrecta de la pleckstrina puede desencadenar el desarrollo de diversas enfermedades en humanos entre las que se incluyen la diabetes o trastornos de coagulación de la sangre (Yang et al. 1996; Ding et al. 2007). El silenciamiento de la pleckstrina produce un descenso en la secreción de dos citoquinas proinflamatorias, alcanzando un 80% en TNF- α y un 75% en IL-1 β . Por tanto, la pleckstrina desempeña un papel fundamental en la respuesta proinflamatoria (Ding et al. 2007).

La pleckstrina induce la reorganización del citoesqueleto de actina siendo necesaria la fosforilación del dominio PH del N-terminal. La reorganización del citoesqueleto de actina se produce vía Rac1 independientemente de cdc42 y del fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K) (Ma and Abrams 1999). Se ha visto con ensayos de inmunoprecipitación y GST *pulldown* que la pleckstrina no se une de forma directa al citoesqueleto de actina, sino que emplea otras proteínas intermediarias como la moesina, radixina, factor XIIIa, α -actinina o 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 4 (Baig et al. 2009).

Se ha observado también que la pleckstrina está implicada en las vías de señalización de fosfatidil-inositol actuando como inhibidor de la hidrólisis mediada por las fosfolipasas C_β y C_γ y de la quinasa PI3K, y por otro lado, activando la 5-inositol fosfatasa I (Abrams et al. 1995).

El dominio PH (*Pleckstrin Homology*), descrito inicialmente, consta de 100-120 aminoácidos presente en cientos de proteínas (por ejemplo Btk), desde levaduras hasta mamíferos. La familia de proteínas que contienen dominios PH es un grupo funcionalmente muy versátil. En muchas ocasiones el dominio PH se requiere para la unión de fosfatidil inositol. Sin embargo, otras proteínas emplean este dominio para la reorganización del citoesqueleto de actina y polarización celular. De hecho, numerosas proteínas de citoesqueleto o reguladoras de citoesqueleto contienen dominios PH (Maffucci and Falasca 2001; Lemmon et al. 2002).

Los resultados de la presente tesis revelaron la presencia de una alta proporción de genes con una mayor expresión diferencial en MEL-DS19 respecto a MEL-R, lo que implica un silenciamiento génico generalizado que puede relacionarse con el desarrollo de un fenotipo resistente. Un grupo destacado que transcribe más activamente en MEL-DS19 pertenece a genes implicados en la regulación del citoesqueleto de actina. Los resultados apuntan a la participación de la red de proteínas del citoesqueleto de actina en la adquisición de resistencia a la diferenciación. Por otra parte, una proporción significativa de genes cuya transcripción es mayor en MEL-R pertenecen a aquéllos que codifican histonas. Se discute una posible contribución de la expresión de histonas, tanto de replicación como variantes, en el proceso de diferenciación.

2. Objetivos

Uno de los objetivos del laboratorio en el que se llevó a cabo la presente tesis doctoral es avanzar en el conocimiento del proceso de diferenciación celular y en los mecanismos celulares y moleculares que provocan su bloqueo. El modelo empleado para tal fin son células eritroleucémicas murinas capaces de retomar el programa de diferenciación en presencia de agentes inductores. Previamente, en el laboratorio se desarrolló una línea celular resistente a la diferenciación, derivada de los progenitores eritroleucémicos. Los objetivos concretos de este trabajo son:

- Identificar genes a través de secuenciación masiva (ARN-seq) cuya expresión diferencial difiera significativamente entre MEL-DS19 y MEL-R, y viceversa.
- Examinar el papel de proteínas específicas del linaje hematopoyético implicadas en la organización y polimerización del citoesqueleto de actina, i.e. Was (*Wiskott-Aldrich syndrome*), Btk (tirosina quinasa de Bruton) y Plek (pleckstrina).
- Establecer transfectantes estables en MEL-DS19 mediante el sistema CRISPR/Cas9 que contengan deleciones para los genes citados en el objetivo anterior. Establecer transfectantes estables que sobreexpresen estos mismos genes en MEL-R.
- Analizar la posible implicación de un aumento de expresión de los genes que codifican histonas en el linaje resistente MEL-R.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cultivos celulares

3.1.1. Líneas celulares

MEL-DS19 (*Murine Erythroleukemia cell Line*). Línea celular eritroleucémica murina cedida por el laboratorio del Dr. Arthur I. Skoultchi del Albert Einstein College of Medicine (U.S.A.). Esta línea deriva de una de las líneas originales que estableció la Dra. Charlotte Friend a partir de tumores subcutáneos de ratones infectados por el complejo vírico Friend (Friend et al. 1966).

MEL-R. Línea celular resistente a la diferenciación derivada de MEL DS-19 establecida previamente en nuestro laboratorio mediante pases sucesivos en presencia de HMBA (Fernandez-Nestosa et al. 2008).

Fibroblastos 3T3-Swiss albino. Línea celular establecida por G. Todaro y H. Green en 1962 en la *University School of Medicine* de Nueva York a partir de células embrionarias de ratón (Todaro and Green 1963).

3.1.2. Condiciones de los cultivos celulares

Las líneas celulares empleadas se cultivaron en medio básico Eagle Modificado por Dubelco, DMEM (Gibco), complementado con suero fetal bovino (Sigma) inactivado a 65°C durante 30 minutos a una concentración final de 10% (v/v), 100 U/ml de penicilina (Life Technologies, Inc.) y 100 µg/ml de estreptomicina (Life Technologies, Inc.). En el caso de la línea celular MEL-R se añadió al medio HMBA (Sigma) a una concentración final de 5 mM. Los medios de cultivo de los transfectantes se complementaron con 1 mg/ml de geneticina (G418). Las células se incubaron a 37°C, en una atmósfera de 95% de humedad y 5% de CO₂.

3.1.3. Tratamiento con inductores de la diferenciación celular

Las células eritroleucémicas MEL-DS19 en presencia de agentes químicos como el HMBA (N,N'-Hexameten-bis-acetamida) o el DMSO (dimetilsulfóxido) son capaces de entrar nuevamente en el programa de diferenciación (Reuben et al. 1976; Marks and Rifkind 1978). Para inducir la diferenciación, se partió de $2,5 \times 10^5$ cel/ml, se trataron con HMBA (Sigma) 5 mM o 2% de DMSO y se tomaron muestras

a distintos tiempos. Las células se incubaron de igual modo al que se indica en el apartado 3.1.2.

3.1.4. Ensayo de benzidina

El porcentaje de células diferenciadas se determinó mediante el test de benzidina (Marks and Rifkind 1978). La benzidina es un agente químico que reacciona con los grupos hemo de las células eritroleucémicas produciendo una coloración azul. Se preparó una solución de benzidina a partir de 0,2 g de benzidina dihidroclorada (Sigma) en 3 ml de ácido acético glacial (Merck) y 97 ml de agua estéril manteniéndolo en agitación durante toda la noche. Para llevar a cabo el test se mezclaron 100 μ l de benzidina, 13 μ l de peróxido de hidrógeno (Merck) y 100 μ l de cultivo celular; posteriormente se procedió al recuento de células en una cámara de Neubauer bajo un microscopio invertido Leica a un aumento de 10x.

Para realizar las preparaciones citológicas se recogieron 1×10^6 células a distintos tiempos de diferenciación con HMBA y se trataron con benzidina. Las imágenes fueron realizadas en un microscopio óptico Zeiss Axioplan con cámara digital Leica DFC 350 FX.

3.1.5. Cinética de crecimiento celular

El crecimiento celular se determinó contabilizando los cultivos en una cámara de Neubauer bajo un microscopio invertido Leica. En todos los casos se realizaron recuentos de al menos tres cultivos celulares. Los datos fueron procesados empleando el *software* Microsoft Office Excel.

3.1.6. Determinación del tamaño celular mediante citometría de flujo

El tamaño celular se analizó mediante citometría de flujo a partir 5×10^5 - 1×10^6 células que se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Las muestras se lavaron en PBS 1x frío y se resuspendieron en 500 μ l de la misma solución. Las células se analizaron en un citómetro de flujo Coulter XL y los datos se procesaron con el *software* FlowJo 8.7.

3.1.7. Análisis del ciclo celular

La distribución de las células a lo largo del ciclo celular se determinó en función del contenido de ADN mediante citometría de flujo empleando yoduro de propidio. Se centrifugaron 2×10^5 - 1×10^6 células a 1000 rpm durante 5 minutos. Las muestras se fijaron con etanol frío al 70% (Merck) durante 30 minutos a 4°C y a continuación se lavaron dos veces con PBS 1x. Los *pellets* fueron tratados con 300 µl de una solución de yoduro de propidio/ARNasa (Immunostep) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La caracterización del ciclo celular se realizó en un citómetro de flujo Coulter XL y el contenido en ADN se examinó con el *software* FlowJo 8.7.

3.2. Preparación y análisis de ARN

3.2.1. Extracción y análisis de ARN

El aislamiento y purificación del ARN se realizó a partir de células MEL-DS19 y MEL-R tratadas o sin tratar con HMBA o DMSO. Se centrifugaron 10^7 células de cada cultivo y se extrajo el ARN empleando el kit Qiagen RNeasy Mini (Qiagen). Se resuspendió el *pellet* con el *buffer* RLT (Qiagen), se añadió un volumen de etanol (Merck) al 70% y se traspasó la mezcla a una columna del kit de extracción. A continuación, las muestras se incubaron con ADNasa (RNase Free DNase Set, Qiagen) y se trataron con los distintos *buffers* del kit RNeasy Mini. Finalmente se eluyó el ARN en agua *RNase free*.

Para determinar la concentración y calidad del ARN extraído se analizó 1 µl de muestra con el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 260 nm. La pureza se determinó mediante lecturas a 280 nm y la obtención del cociente: Absorción 260 / Absorción 280.

Para analizar la integridad del ARN se utilizaron geles de agarosa en condiciones denaturalizantes. Las muestras se prepararon a partir de una mezcla de 2-5 µg de ARN, formamida al 50% (Calbiochem), *loading buffer* al 2%, formaldehído 37% (5,5%) (Merck) y bromuro de etidio (Sigma) a 1 mg/ml. Los geles se prepararon con agarosa Seakem (FMC BioProducts) en MOPS 1x (Sigma) y formaldehído 37% (8%). La electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora y media a

90 V. El gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta de 250 nm de longitud de onda.

3.2.2. Análisis de la expresión génica mediante ARN-seq

El análisis de la expresión génica diferencial entre la línea parental y la resistente se llevó a cabo mediante técnicas de secuenciación masiva de ARN, ARN-seq. Se generaron librerías a partir de 1 µg de ARN (TruSeq RNA Sample Preparation Kit, Illumina, San Diego, CA) basadas en el aislamiento de poliA+. Las concentraciones de ARN fueron 326-394 ng/µl con un valor de integridad del ARN (RIN) de 9,80. Las librerías con una longitud de 337-367 nucleótidos se cuantificaron por PCR (Kapa Biosystems, Woburn, MA) empleando una librería previa estándar. Las librerías se cargaron en un aparato Cluster Station (Illumina) y se secuenciaron en un Illumina GAllx (Parque Científico de Madrid) en una sola lectura por protocolo (1x75). Las lecturas fueron de 25 millones y 17 millones en MEL-DS19 y MEL-R respectivamente. El análisis bioinformático de los datos se realizó empleando la referencia del genoma de ratón (NCBI) con TopHat v2.0.1 y DESeq además de Cufflinks v2.0.0 para identificar los transcritos expresados diferencialmente (Trapnell et al. 2012). Los archivos de datos generados en el ARN-seq se encuentran depositados en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO), www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (Nº de acceso GSE83567).

3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.3.1. Síntesis de ADNc, RT-PCR

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 2 µg de ARN extraído de MEL-DS19 y MEL-R tratados o sin tratar con HMBA o DMSO empleando la siguiente mezcla: 500 µg/ml de Oligo-dT (Invitrogen) que se anilla en la región 3' de poli A del ARNm o 50-250 ng de random *primers* (Invitrogen) que se une a diferentes secuencias del ARN; 0,5 mM de dNTPs y 200 unidades de SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). En el caso del Oligo-dT la reacción se llevó a cabo a 42 °C durante 50 minutos y se inactivó la enzima a 70 °C durante 15 minutos; con los random *primers*

las condiciones fueron 25°C durante 10 minutos, 42 °C durante 50 minutos y se inactivó la enzima a 70 °C durante 15 minutos.

3.3.2. Amplificación y análisis por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Se amplificaron fragmentos de ADNc mediante PCR empleando una Taq polimerasa (Invitrogen) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C durante 7 minutos seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 40 segundos, anillamiento a 55-65 °C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 1 minuto, inactivando finalmente la enzima a 72 °C durante 7 minutos.

El análisis de los fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. Se tomaron 10-15 µl de las reacciones de PCR y se efectuó una electroforesis a 80-90 V durante 90 minutos en un *buffer* TBE 1x. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (Sigma) a 1 µg/ml y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta de 250 nm de longitud de onda.

Tabla I. Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Amplificación (bp)
<i>Hist1h1c</i>	TGGAAGTTTGGGAGAAGGTG	TCTCAGTCCCGAGTCCAACT	119
<i>Hist1h1d</i>	CGTCTACGTTTCAATCTAGCATTTTC	TGAGGCTCGAATACAAGATCC	66
<i>Hist1h2ba</i>	GTGGCGTTTCACACAACAAG	GCAGCCCTACCGACTGTTAC	120
<i>Hist1h2bc</i>	CTCCAAGTGATCCTGCCAAG	CCATTGCACTGTCTTGAGG	90
<i>Hist1h2bg</i>	CGGTACTAAAAGGCCAGACG	TTCCTTATTGGCTGCAGAGG	105
<i>Hist1h2bj</i>	CCGACACCGGTATCTCCTC	GTCGAGCGCTTGTTGTAATG	114
<i>Hist1h2bk</i>	CGAGGTTTGGGAGTTGTGT	AGTGAAATGCCCTTGCTGG	90
<i>Hist1h2bl</i>	AATTCGCAGCAGCCTGTAGT	GGTTGGGGTGTGAATACCAG	90
<i>Hist1h2bn</i>	CAGCCTGTGCAGACACACTT	CCTTCTTGACCCCTTCTTC	120
<i>Hist1h2bp</i>	TGCCTGAGCCTGTAAAGTCC	CACCGAGTAGCTCTCCTTGC	119
<i>Hist2h2aa1</i>	GCCCCGCTCTCTGTGATA	GGCTACCGTGACACAACCTCTT	95
<i>Hist2h2aa2</i>	GCCCCGCTCTCTGTGATA	GGCTACCGTGACACAACCTCTT	94
<i>Hist2h2be</i>	CTTCTTGAGTTCTTTTAGACTAGGA	AAAGCCTAGAACACGGAAACC	71
<i>Hist2h3c2</i>	CATTCCCCACAAAGGCTCT	GCTCTAAGCGAAGTAAACAGCTC	70
<i>Hist3h2a</i>	TGGAGGGAGGTGTACTAGGG	TTGGGTAGTGGTTGTGCATTT	71
<i>H1f0</i>	CAAAGCCCCAAGCAAGAA	CAACCTTGGGCTTTTGG	93
<i>H2afx</i>	GTTGCTGGCCTCATACCACT	GCCGGGAGGTATTCTTAGAG	111
<i>H3f3b</i>	CAGGATTTCAAACCGACTTG	CCCACCAGGTATGCTTCG	108
<i>Was</i>	GGATCTGCGGAGCTTGTCTC	AGACCTCCCTGGTCTCAAT	105
<i>Plek</i>	CTTGAGAGGCTGTGTGGTGA	ATTACTTGCAAGGCAGCCACT	121
<i>Arhgef10l</i>	TAATGGAGATGGAGCCCAAG	AGCGATCTGGAACATGGAGT	101
<i>Rac2</i>	CCTAGGTACGGCACCCT	GGATCTGACCAACCTGGAGC	98
<i>Dock2</i>	AAACAAGGGAGCTACGCTGA	ATTCTGGGTGAGCTTTGTGG	115
<i>Btk</i>	TGGCTGCCTCTTGAACCTACC	AAGGAACTGCTTCGACTCCA	118
<i>Nckap1l</i>	ACTTTGGCTGGCTACAATGC	AAGCATCTGCACCCAAAAAC	121
<i>Dnmt1</i>	AAAGTGTGATCCCGAAGATCAAC	TGGTACTTCAGGTTAGGGTCTGCTA	79
<i>Dnmt3a</i>	TGCTACATGTGCGGGCATAA	GGAGTCGAGAAGGCCAGTCTT	70
<i>Dnmt3b</i>	CCCAAGTTGTACCCAGCAATTC	TGCAATTCCATCAAACAGAGACA	75
<i>Tet1</i>	GCGTGAAGCTCAAACATCAA	GTGCAGCTTCTGTTCCTTC	143
<i>Tet2</i>	GATCCGTCATCTGAGGCTCA	TGGCCTGTTGACTCAAATGC	103
<i>Tet3</i>	GCAAGGAGGGGAAGAGTTCT	ATCACGGCGTTCTGACAATG	127
<i>Actina</i>	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	ACCAGAGGCATACAGGGACA	103
<i>GAPDH</i>	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452

3.3.3. Cuantificación de la expresión génica relativa mediante PCR a tiempo real

La determinación de la expresión relativa de genes que presentaron una expresión diferencial en MEL-DS19 y MEL-R tratada o sin tratar con HMBA o DMSO se realizó empleando una mezcla de 1x SYBR Green Supermix (BioRad), 1 µl de ADNc y 0,2 µM de cada oligonucleótido. Los oligonucleótidos empleados, representados en la Tabla I, fueron diseñados utilizando el *software* Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Untergasser et al. 2012) y sintetizados por

Sigma. La reacción se llevó a cabo en el iQ5 System (Bio-Rad) siguiendo las

Tabla II. Oligonucleótidos empleados en el análisis con bisulfito

condiciones que se detallan: una pre-denaturación del ADN a 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos y 60 °C durante 30 segundos, con un paso final de 60 °C hasta 94 °C subiendo 1 °C cada 10 segundos.

El análisis de la expresión relativa a partir de las Cts obtenidas se efectuó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen and Livak 2008) empleando el *software* BioRad iQ5 2.0 Standard Edition Optical System y Microsoft Office Excel. Previamente, se comprobó la eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos mediante una curva estándar de calibrado.

3.4. Caracterización de la metilación de los promotores mediante conversión con bisulfito y secuenciación

La metilación del ADN en mamíferos ocurre en los sitios o islas 5'-CpG-3' de los promotores de los genes. El tratamiento con bisulfito transforma las citosinas no metiladas en uracilos mientras que las metiladas permanecen intactas, propiedad que permite discernir los sitios metilados mediante una secuenciación. El ADN genómico de las muestras se trató con bisulfito empleando el kit EZ DNA Methylation-Direct (Zymo Research). Se partió de 8×10^4 células siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN tratado (4 µl) se amplificó por PCR usando oligonucleótidos específicos de cada región y la ZymoTaq DNA Polymerase (Zymo Research). Las condiciones de la reacción fueron: un primer paso de denaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 55-60 °C 40 segundos y 72 °C 40 segundos, con una extensión final a 72 °C 7 minutos. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados fueron diseñados con el *software* MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) (Li and Dahiya 2002) y se detallan en la Tabla II. Los productos de PCR se resolvieron en un gel al 1% de agarosa y se secuenciaron en el servicio de Secuenciación Automática Secugen (CIB, Madrid).

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Btk	AAAAATGTTTTTTAGAAAATGATTTAGTA	ACCCTCTCTAAACAAAAAAATAAC
	TGTAAAGAGGTTTTAGGTAAATGT	TTAATACAAATAACTCCCCAAC
Plek	TTTAGGATTTGTGGGGATAATAAAG	CAACCCATACTTCTCTAATAATAAAATAA
	AATTTTAAAGTAGGATAGTTTAGG	CCTTTTACAAAAAAATCTCTTTCAC
	TTTAGAGAGGGGAAAAGGATGTTAT	ACAACCCACATAAATTTCCAAATAT
Was	AATGTAATGGTTTTTAGTATTGGAGTT	TTCCTTCTAACAAACTTAAATCAACCT
	TAAGTTTGTTAGAAGGAAATGGTTT	ACTACCTTCTACCTTAATCCTCTCCA
	TTTTGAAGGAGAAGTTTTGTAGATG	TCTAAAACAAACATAAACCTCCTC
Hist1h2bg	GGATGGTTAGTTGTAGGTGG	TAACAAACAAAAATAACAAACTC
Hist1h2bk	AATAGTAGAAATAAAGGGAAATTTGTAGA	CAAAACAAACAAATAAAAAACACCAC
Hist1h2bp	TTTTGGTTTTGTGGTGGTTTT	CCACCTACAACCTAACCATCC

3.5. Preparación y análisis de proteínas

3.5.1. Caracterización de la expresión de la proteína HP1 α mediante citometría de flujo

Se analizó la expresión de HP1 α a partir de 3×10^6 células de cultivos de MEL-DS19 sin tratar (0h), MEL-R y células MEL-DS19 tratadas con HMBA durante 72 horas (72h). Las células se fijaron en etanol frío al 70% (Merck) seguido de una permeabilización con 0,1% de Triton X-100 (Sigma) en PBS 1x (PBS-T) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se trataron con PBS-T con BSA (Sigma) al 1% durante 1 hora y se incubaron posteriormente con el anticuerpo primario Anti-HP1 α (Tabla I) en PBS-T con BSA al 1% durante una hora a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo varios lavados con PBS 1x y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario Goat-anti-mouse Alexa 488 (Molecular Probes) a una dilución 1:1000 en PBS-T con BSA al 1%. Tras realizar varios lavados con PBS 1x las células se analizaron mediante un citómetro de flujo Coulter XL. Los datos se procesaron con el software FlowJo 8.7.

3.5.2. Inmunocitoquímica

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron con 1 ml de cultivos celulares en crecimiento exponencial (10^6 - 10^7 cel/ml) sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Las células se fijaron en paraformaldehído 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se

permeabilizaron con 0,1% de Triton X-100 (Sigma) en PBS 1x (PBS-T) durante 30 minutos. Se realizó el bloqueo en PBS-T con BSA (Sigma) al 1% durante 1 hora. Las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios Anti-HP1 α (Bartova et al. 2007), Anti- β Actina o Anti-Btk (Tabla III) en PBS-T con BSA al 1% durante una hora, seguido de dos lavados en PBS 1x. Se procedió a la incubación de las células con el anticuerpo secundario Goat-anti-mouse Alexa 488 o Alexa 568 (*Molecular Probes*) a una dilución 1:400 y 1 μ g/ml de DAPI en PBS-T con BSA al 1% durante 1 h. Tras realizar dos lavados con PBS 1x las muestras se montaron con ProLong Diamond Antifade (Invitrogen), calentado previamente a 37°C durante 20 minutos, y se dejaron secar a 4°C.

Las imágenes se captaron con el microscopio Leica TCS SP2 Confocal Laser con un objetivo de 63x o 100x de inmersión y zoom.

3.5.3. Inmunodetección de proteínas

La obtención de extractos proteicos totales se llevó a cabo a partir de $2,5 \times 10^6$ células. Se efectuó un lavado en PBS 1x frío y se trataron con 100 μ l de *buffer* NP-40 (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, glicerol 10% (Roche), NaCl 137 mM, NP-40 1%, cóctel de inhibidores de proteasas 0,1 μ g/ml, ortovanadato sódico 1 mM, fluoruro sódico 10 mM, EDTA 2 mM; (Sigma)). Las muestras se incubaron durante 20 minutos a 4°C con agitación ocasional. Se separaron los restos celulares de las proteínas mediante una centrifugación a 15000 rpm durante 25 minutos a 4°C.

La separación proteica (10-30 μ g) se realizó en geles SDS-poliacrilamida al 12% y se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad) mediante electrotransferencia húmeda durante 90 minutos a 200 mA. Se realizó un bloqueo en leche en polvo diluida en T-TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,1% (Sigma)) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se incubó con el anticuerpo primario (Tabla III) durante 16 horas a 4°C. La membrana se lavó 5 veces durante 5 minutos en T-TBS y se incubó 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa Anti-mouse (Santa Cruz sc-2005, 1:3000) o Anti-rabbit IgG (DAKO P0448, 1:1000) según corresponda. Se lavó 5 veces

durante 5 minutos en T-TBS y se detectó mediante el quimioluminiscente LiteAblot Plus Enhanced Chemiluminescent Substrate (Euroclone).

Tabla III. Anticuerpos primarios empleados en diversas técnicas

Anticuerpo primario	Referencia	Inmunocitoquímica (Dilución)	Western blot (Dilución)	Citometría de flujo (Dilución)
α -Tubulina	ABClonal AC007		1:1000	
β - Actina	Sigma A1978	1:3000	1:10000	
Wasp	Santa Cruz sc-13139		1:500	
Btk	Santa Cruz sc-28387	1:200	1:500	
Plek	Santa Cruz sc-136042		1:1000	
HP1 α	clone 15, 19s2, Upstate, USA	1:500	1:1000	1:500
Sam68	Santa Cruz sc-333		1:1000	

3.5.4. Separación de la conformación monomérica y filamentosa de la actina

La actina puede encontrarse en dos conformaciones distintas en las células: globular (G-actina) o filamentosa (F-actina). El aislamiento de ambas configuraciones se realizó mediante un proceso de sedimentación. La separación de ambas conformaciones se llevó a cabo a partir de 10^7 células que se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y se lavaron en PBS 1x. La ruptura de la membrana celular se produjo añadiendo a las muestras 300 μ l de solución de lisis (PIPES 50 mM pH 6.9 (Sigma), $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 5 mM (Sigma), glicerol 5% (Roche), β -mercaptoetanol 0,1% (Merck), PMSF 1 mM (Roche), benzamidina 10 mM (Sigma) y ATP 1mM (Roche)). Se tomaron 100 μ l del lisado y se realizó una ultracentrifugación a 100.000 g durante 1 h a 37°C donde se recogió la F-actina en el *pellet* mientras que la G-actina se mantuvo en el sobrenadante. Los 100 μ l de sobrenadante se mezclaron con el mismo volumen de *buffer* de carga de *Western blot* (Urea 5 M,

Tris-HCl 1 M pH 6.8, SDS 20%, glicerol 85%, azul de bromofenol 0,002 %, β -mercaptoetanol 5%) en un volumen final de 200 μ l; el *pellet* se resuspendió en 200 μ l del mismo *buffer*. Se analizaron alícuotas de 20-25 μ l mediante *Western blot* empleando un anticuerpo Anti- β -actina como se detalla en el apartado 3.2.3.

El experimento se validó mediante un tratamiento de MEL-DS19 y MEL-R con jasplacolinoda y citocalasina D. La jasplacolinoda es un compuesto originalmente aislado de una esponja marina que induce la polimerización de actina (Bubb et al. 1994). La citocalasina D es un metabolito obtenido de un hongo capaz de unirse a los filamentos de actina impidiendo su polimerización y elongación (Cooper 1987). Las muestras se procesaron como se detalla en el protocolo anterior añadiendo un paso en el que se realizó un tratamiento con 10 μ M de ambos compuestos seguido de una incubación durante 2 horas a 4°C previo a la ultracentrifugación.

3.6. Transfecciones

3.6.1. Tranfecciones con cationes lipídicos

Las transfecciones llevadas a cabo en las líneas MEL-DS19 y MEL-R se realizaron a partir de 5×10^6 células. Se incubó 50 μ l de lipofectamina 2000 (Life Technologies) en 100 μ l de OptiMEM (Gibco) durante 30-45 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 5-7 μ g de plásmido diluido en 300 μ l de OptiMEM y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 550 μ l de OptiMEM y se añadió la solución de lipofectamina y vector. Se incubaron a 37°C durante 6 horas y se incorporó medio DMEM completo.

3.6.2. Transfectantes estables derivados de MEL-R

En las transfecciones estables realizadas en la línea resistente se emplearon los siguientes vectores de expresión:

MEL-R pCMV6 Plek (Origene): vector que contiene la secuencia codificadora de Plek bajo el promotor CMV6.

MEL-R pCMV6 Btk (Origene): vector que contiene la secuencia codificadora de Btk bajo el promotor CMV6.

MEL-R pcDNA3.1-+DYK Was (GeneScript): vector que contiene la secuencia codificadora de Wasp bajo el promotor CMV6, de aquí en adelante denominado pcDNA 3.1-Was.

3.6.3. Transfecciones para generar deleciones en la línea celular

MEL-DS19 mediante el sistema CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR es un mecanismo de defensa perteneciente a ciertas bacterias y arqueas. El locus CRISPR está formado por genes Cas, que codifican nucleasas, y repeticiones separadas entre sí por espaciadores que corresponden a secuencias exógenas. En el sistema CRISPR tipo II cuando se transcribe este locus da lugar a un conjunto de ARNs no codificantes (ARNcr) que se procesan y forman ARNs dúplex de 20 pb llamados ARNsg. Éste actúa como guía y se asocia a la nucleasa Cas9 que reconoce la secuencia y se dirige a la región de ADN (o ARN) que va a cortar (Hsu et al. 2014).

Basándonos en este sistema y en la estrategia empleada anteriormente para establecer deleciones en el genoma de células MEL-DS19 (Bauer et al. 2015) se delecionó el gen completo de *Was* o los tres primeros exones de *Btk* y *Plek*. En las transfecciones se emplearon tres vectores (Figura 8A): pEFBOS-GFP que contiene la región codificadora de la proteína GFP y dos vectores pX330 (ID 42230, Addgene) a los cuales se les clonó en BbsI la secuencia guía para la endonucleasa Cas9 de los dos extremos diana del fragmento del genoma que va a ser delecionado, ARNsg 1 y ARNsg 2 (Tabla IV). A las 72h de la transfección se separaron los clones mediante *cell sorting* seleccionando las células vivas de la población total (marcado con un círculo rojo discontinuo) y a continuación las células transfectada (Figura 8B). Las células GFP positivas (5% aproximadamente en cada transfección) se separaron en placas de 96 pocillos a razón de 1 célula por pocillo.

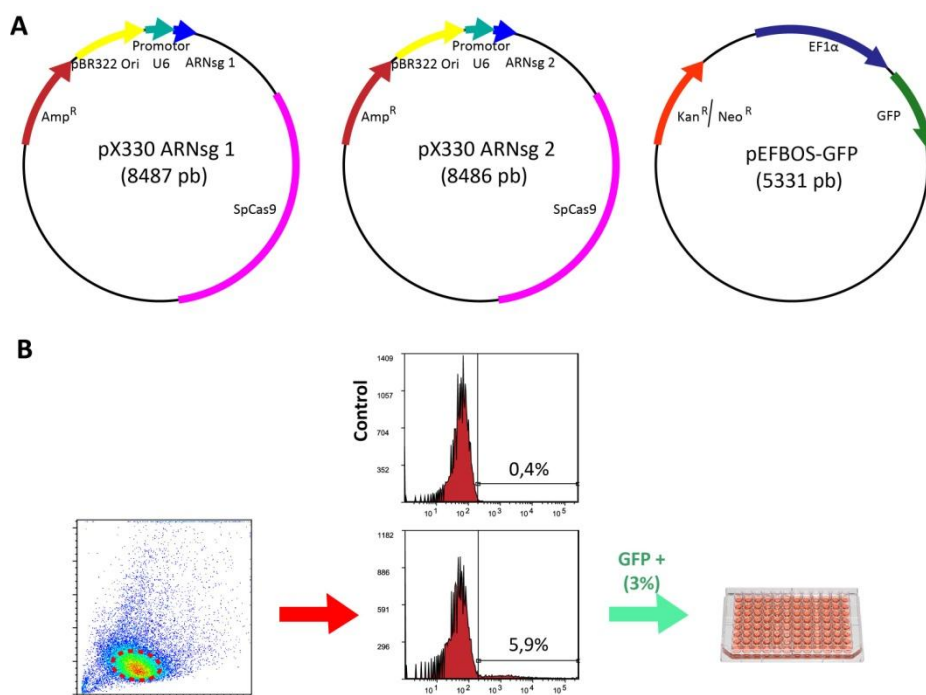


Figura 8. Vectores empleados para inducir deletiones en el genoma de MEL-DS19 y selección de transfectantes. A) Mapa de los tres vectores utilizados en cada transfección para inducir deletiones en el ADN de MEL-DS19 basado en el sistema CRISPR/Cas9. Dos vectores contienen la secuencia codificadora de la endonucleasa Cas9 y las secuencias de los extremos del genoma donde se va a producir la escisión (ARNsg 1 y ARNsg 2). El tercer vector transcribe GFP, necesario para la detección de los clones transfectados. B) Esquema de la selección de transfectantes mediante *cell sorting*. En el primer panel se muestra la población a partir de la cual se separaron las células vivas (círculo rojo discontinuo). Aproximadamente el 5% de las células vivas expresan GFP (GFP+) como se observa en el segundo panel. Se seleccionaron el 3% de células cuya señal de GFP es mayor y se separaron en placas de 96 pocillos a razón de 1 célula por pocillo.

La selección de clones con deletiones bialélicas se realizó mediante amplificación por PCR siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 3.4.2. empleando las parejas de oligonucleótidos de delección (D), cuyo anillamiento se produce corriente arriba de la región de corte, y no delección (ND), cuya unión se produce dentro de la zona escindida (Figura 9A). Las secuencias de las parejas de oligonucleótidos empleadas se representan en la Tabla V. Se pueden identificar tres tipos de clones en función del patrón de bandas obtenidas: sin delección, con delección monoalélica y con delección bialélica (Figura 9B). 1) Si no se ha producido delección, solo habrá amplificación con los oligonucleótidos de no delección, mientras que los de delección no pueden funcionar correctamente dado que el fragmento es demasiado grande. 2) Si la delección es monoalélica ambas parejas de oligonucleótidos darán lugar a una banda en el gel de agarosa. 3) Los clones que nos

resultan más interesantes son los bialélicos cuya amplificación por PCR sólo es posible con la pareja de oligonucleótidos de delección.

Para identificar y aislar clones bialélicos se realizaron más de 32 geles de agarosa de 20 pocillos analizando los resultados obtenidos por PCR con la pareja de oligonucleótidos de no delección (ND) para identificar y aislar clones bialélicos de *Was*, *Plek* y *Btk*. En la Figura 9C se muestran algunos ejemplos de estos geles de agarosa. Aquellos clones en los que se produjo amplificación fueron descartados ya que son transfectantes en los que no hay delección o la delección es monoalélica. Los asteriscos destacan los posibles clones bialélicos sobre los que se realizó una PCR con la pareja de oligonucleótidos de delección y repitiéndose además con los ND.

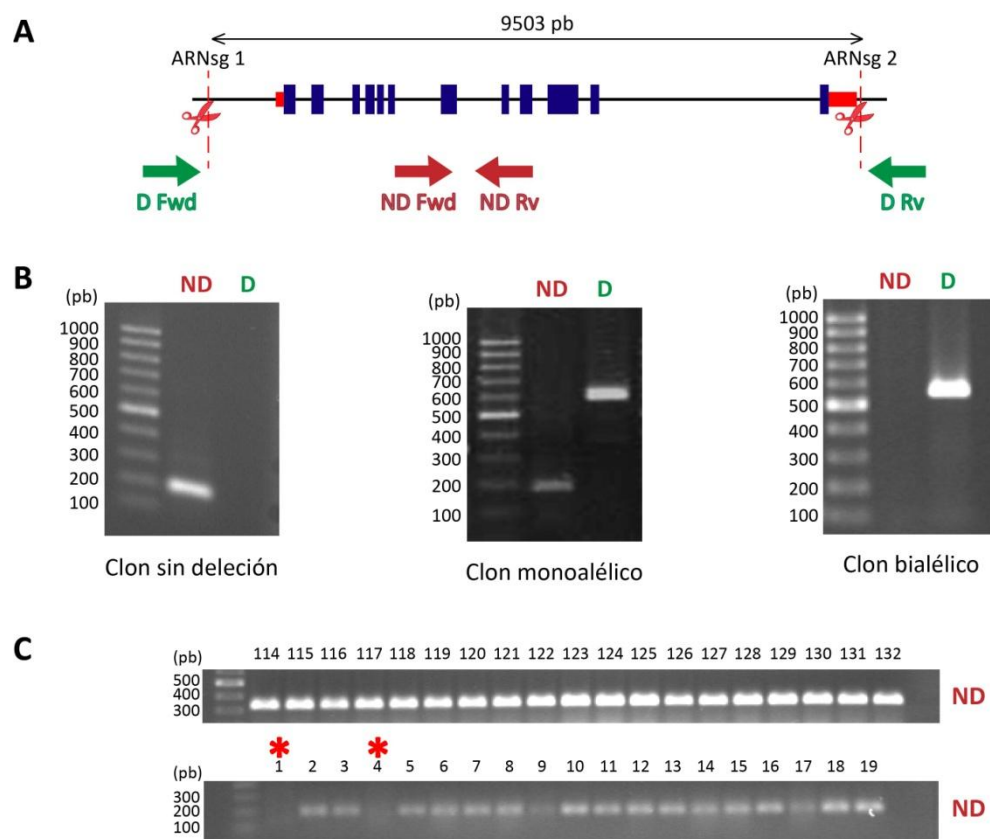


Figura 9. Selección de clones con delecciones bialélicas. Se analizó el tipo de delección (monoalélica o bialélica) de los transfectantes aislados previamente por *cell sorting* mediante amplificación por PCR. A) Mapa genómico de uno de los genes en los que se indujo su delección. Los exones se representan con rectángulos azules y el 5' y 3' UTR con rectángulos rojos. Las líneas discontinuas rojas indican las regiones (ARNsg 1 y ARNsg 2) donde la endonucleasa Cas9 provoca su escisión. Las flechas verdes y rojas corresponden a las parejas de oligonucleótidos de delección (D) y no delección (ND) respectivamente, que se emplearon en las amplificaciones por PCR. B) PCR de los clones sin delección, con delección monoalélica o con delección bialélica con las parejas de oligonucleótidos de no delección (ND) y delección (D). C) Productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos de no delección (ND) analizados en geles de agarosa. Los asteriscos destacan los posibles clones bialélicos.

Tabla IV. Secuencias clonadas en el vector pX330

Gen	ARNsg 1 (5'-3')	ARNsg 2 (5'-3')
<i>Was</i>	CACCGAAGGCATATTGAGCCGGGCG	CACCGTAAAGAAATACAGGCGACG
<i>Btk</i>	CACCGTACACCTGCATGCCGCAAG	CACCGCAGAAAATGGTATAATCCGA
<i>Plek</i>	CACCGGGTCCACTCTTGTCTGTCTG	CACCGCCCAACAGAGACTCGGAAA

Tabla V. Oligonucleótidos empleados en el chequeo de clones CRISPR/Cas9

Gen	Pareja	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Amplicón (pb)
<i>Was</i>	ND	TGTGACGGTCGACATTCAGA	TCAGATGCTTTCCCACCCAT	191
	D	TATCATTGGCAACGTCCAAA	GACATGGTGGCACTTGTCTG	602
<i>Btk</i>	ND	TGGGGCTTATGGTTTCAAAG	CCCAGTCGAAGTGTGGTTTT	203
	D	GGCTATGTTGTCGGGCTCTA	TGTTGCCTGGGTTACCTTTC	661
<i>Plek</i>	ND	GAACCAGAAGCAGGCAAGTC	ACCAACTCCTGGTTCCACAG	341
	D	TTGTGGGGACAACAAAGACA	TGGGACCTTACCCAAGTGAG	763

4. Resultados

4.1. Caracterización de las líneas celulares MEL-DS19 y MEL-R

4.1.1. Características de la diferenciación celular en la línea MEL-DS19

La línea celular MEL-DS19 deriva de precursores hematopoyéticos transformados con el complejo vírico Friend cuya integración provoca un bloqueo en la entrada del proceso de diferenciación celular (Friend et al. 1966). La presencia de agentes químicos como el HMBA o el DMSO son capaces de inducir la diferenciación hacia el linaje eritroide (Reuben et al. 1976; Marks et al. 1994). Cuando los cultivos se exponen a un tratamiento con 5 mM de HMBA se produce un aumento progresivo de células diferenciadas alcanzando un 90% aproximadamente a las 96 horas (Figura 10A). Las células diferenciadas se detectaron mediante un test de benzidina, agente químico que reacciona con los grupos hemo de las células produciendo una coloración azul. En la Figura 10B se muestra un cultivo en ausencia del agente inductor (0h) y en presencia de HMBA durante 120 horas. Debido a la alta concentración de hemoglobina en las células diferenciadas tras una centrifugación se obtienen *pellets* de color rojo como se muestra en la Figura 10C; aquéllos que se mantienen sin HMBA (0h) dan lugar a un sedimento blanco. Estos resultados permitieron comprobar que los cultivos de células MEL-DS19 responden al agente inductor HMBA retomando el programa de diferenciación.

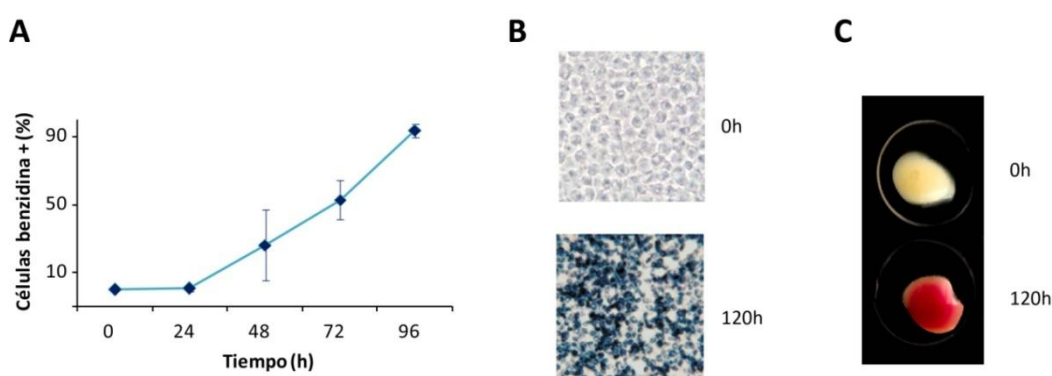


Figura 10. Dinámica de diferenciación celular inducida por HMBA. Se trataron cultivos de células MEL-DS19 en presencia de 5 mM de HMBA durante 96-120 horas. A) Se determinó el porcentaje de células diferenciadas a distintos tiempos mediante un test de benzidina. Las barras representan las desviaciones estándar de cada ensayo por triplicado. B) Imágenes del ensayo con benzidina en células MEL-DS19 indiferenciadas (0h) y diferenciadas (120h). Los grupos hemo de la hemoglobina reaccionan con la benzidina produciendo una coloración azul. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio óptico con un aumento 40x. C) *Pellets* de cultivos sin tratar (0h) o expuestos durante 120 horas al HMBA (120h).

Aún cuando el porcentaje de diferenciación alcanza niveles elevados, aproximadamente un 10% de las células no responde al agente inductor. A partir de esta población se estableció previamente en el laboratorio la línea celular MEL-R que permanece en un estado proliferativo y presenta características fenotípicas y moleculares distintas a la de la línea progenitora.

4.1.2. Características fenotípicas de las células resistentes a la diferenciación

Se analizó la cinética de crecimiento y el tamaño celular de MEL-R respecto a la línea parental MEL-DS19. Se utilizaron tres cultivos independientes creciendo en fase exponencial y se recogieron alícuotas por triplicado a intervalos de 24 horas (Figura 11A y B). Se observó que el tiempo de duplicación de MEL-DS19 es próximo a las 12 horas mientras que en MEL-R se alcanzan valores de 18 horas aproximadamente.

El estudio comparativo de los tamaños celulares relativos de MEL-DS19 y MEL-R se realizó mediante citometría de flujo. Se observó un aumento significativo del tamaño celular en MEL-R, tal como indica el desplazamiento de la curva en el gráfico de la Figura 11C.

Estos resultados han permitido corroborar las diferencias fenotípicas relativas a la duración del ciclo celular y a un aumento del tamaño en las líneas resistentes, parámetros que podrían estar interrelacionados.

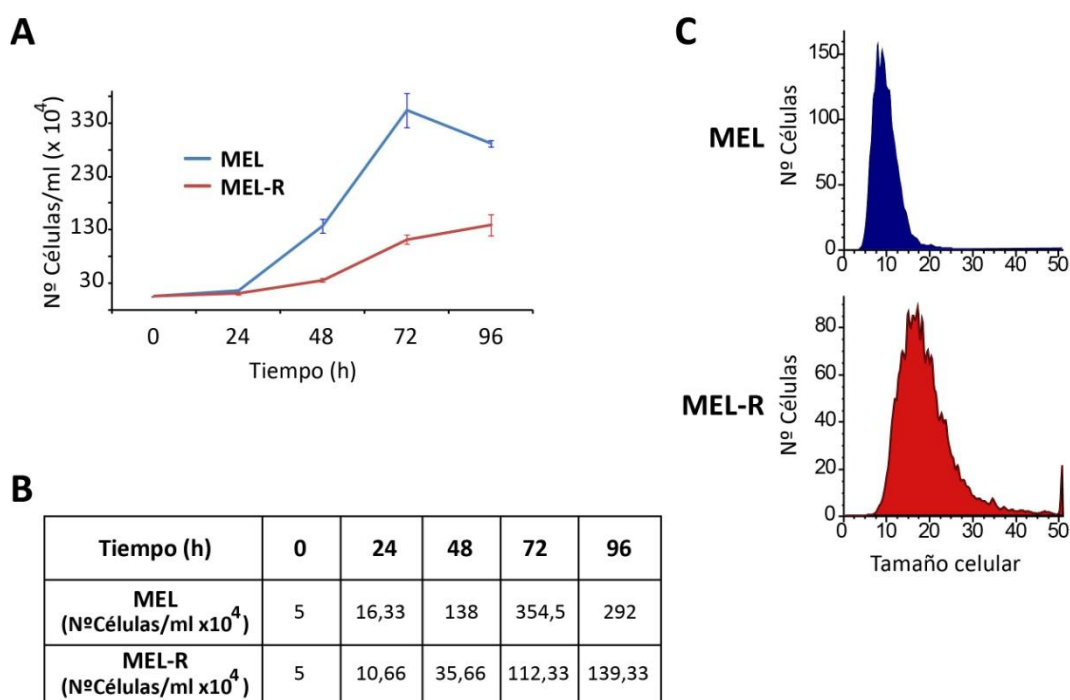


Figura 11. Cinética de crecimiento y tamaño celular de MEL-DS19 y MEL-R. A) Curva de crecimiento de células MEL-DS19 y MEL-R durante 96 horas. Las barras representan las desviaciones estándar de cada ensayo por triplicado. B) Número de células/ml ($\times 10^4$) de cultivos MEL-DS19 y MEL-R representados en A). C) Tamaño celular de MEL-DS19 y MEL-R analizado mediante citometría de flujo.

4.1.3. Análisis de los niveles de HP1 α en MEL-R

Otro de los parámetros estudiado fue el grado de compactación de la cromatina en base a los niveles de la proteína HP1 α cuyos niveles indican el grado de heterocromatinización. Con el objeto de comparar el nivel de heterocromatinización en las células MEL-R con respecto a la línea progenitora se determinó la cantidad de proteína HP1 α mediante técnicas inmunohistoquímicas y citometría de flujo. La inmunolocalización de HP1 α en MEL-DS19, tratadas (72h) o sin tratar con HMBA (0h) permitió observar un incremento de la señal según aumenta el tiempo de exposición de las células al HMBA. En células MEL-R se obtuvieron valores intermedios entre MEL-DS19 0h y diferenciadas (72h) (Figura 12A). La citometría de flujo confirmó estos resultados observándose un incremento de la señal en células MEL-R respecto a MEL-DS19, señal cuyo aumento es mayor después de 72 horas de diferenciación (Figura 12B). Estos datos fueron avalados por

un *Western blot*, en el cual se detectó el mismo patrón de expresión de HP1 α (Figura 12C).

Estos resultados indican una gradual heterocromatinización de las células MEL-DS19 según avanza el programa de diferenciación. Las células MEL-R por su parte, presentan una cromatina más condensada respecto a la línea parental, pero sin llegar a los niveles de las células diferenciadas lo cual manifiesta un estado intermedio entre ambas situaciones. En conjunto estos datos demuestran que hay diferencias fenotípicas entre MEL-DS19 y MEL-R que conciernen al tamaño celular, al ciclo celular y al estado de la cromatina.

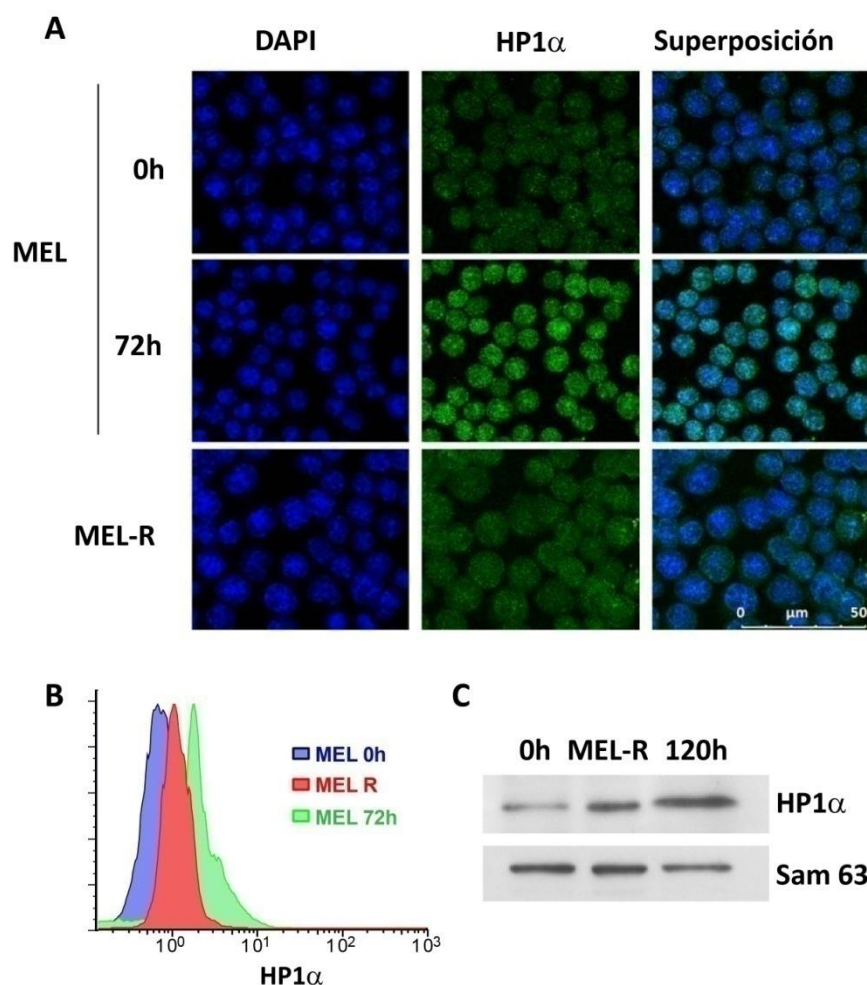


Figura 12. Análisis del estado de la cromatina en MEL-R. A) Inmunolocalización de la proteína HP1α. Los núcleos de las células MEL-DS19 y MEL-R se tiñeron con DAPI. Se añadió el anticuerpo primario anti-HP1α y el anticuerpo secundario Alexa 488 que emite fluorescencia verde. Las imágenes se capturaron en un microscopio confocal con un objetivo 64x. Barra de escala = 50 μm. B) Niveles de HP1α medido por citometría de flujo. La señal de la proteína correspondiente a células MEL-DS19 se representa en color azul mientras que las células diferenciadas y las resistentes se muestran en verde y rojo, respectivamente. C) Cuantificación de la HP1α mediante *Western blot*. Cantidades similares de extractos proteicos de cada muestra se analizaron en una inmunodetección empleando como control de carga la proteína nuclear Sam 63.

4.1.4. Estudio de la ploidía en células resistentes a la diferenciación

Numerosos estudios han sugerido que la poliploidía promueve la evolución y la adquisición de un fenotipo resistente en terapias de pacientes con cáncer. (Fujiwara et al. 2005; Margolis 2005; Coward and Harding 2014). Basándonos en los datos previos y en el aumento de tamaño celular observado en las células MEL-R (Figura 11), realizamos un análisis del contenido en ADN de estas células para verificar el grado de ploidía. El perfil de las distintas fases del ciclo celular que se deduce de los resultados del análisis mediante citometría de flujo es similar en MEL-

DS19 y MEL-R (Figura 13A, 0h y MEL-R). En los cultivos en fase de diferenciación las células dejan de proliferar acumulándose en la fase G1 del ciclo celular (Figura 13A, 96h), datos que corroboran resultados anteriores (Marks et al. 1994; Vanegas et al. 2003; Fernandez-Nestosa et al. 2008). El contenido de ADN de la línea progenitora y las células resistentes difiere observándose un contenido 4C en las células resistentes lo cual indica que la adquisición de un fenotipo tetraploide por parte de las MEL-R.

La poliploidía se ha descrito en diferentes células tumorales como resultado de la endoreplicación inducida por estrés (Storchova and Pellman 2004; Lee et al. 2009). La presencia continua de HMBA en los cultivos de MEL-R podría suponer una situación comprometida capaz de inducir un fenotipo favorable a la supervivencia celular. Se analizó el ciclo celular de MEL-R expuesto a dos concentraciones distintas del compuesto (5 y 10 mM) o en su ausencia (0 mM) con el fin de detectar variaciones en los perfiles del ciclo que indicarían una posible relación entre la dosis empleada y la ploidía observada (Figura 13B). Se observó que en todos los casos las células mantienen la tetraploidía independientemente de la cantidad de HMBA empleada en su cultivo.

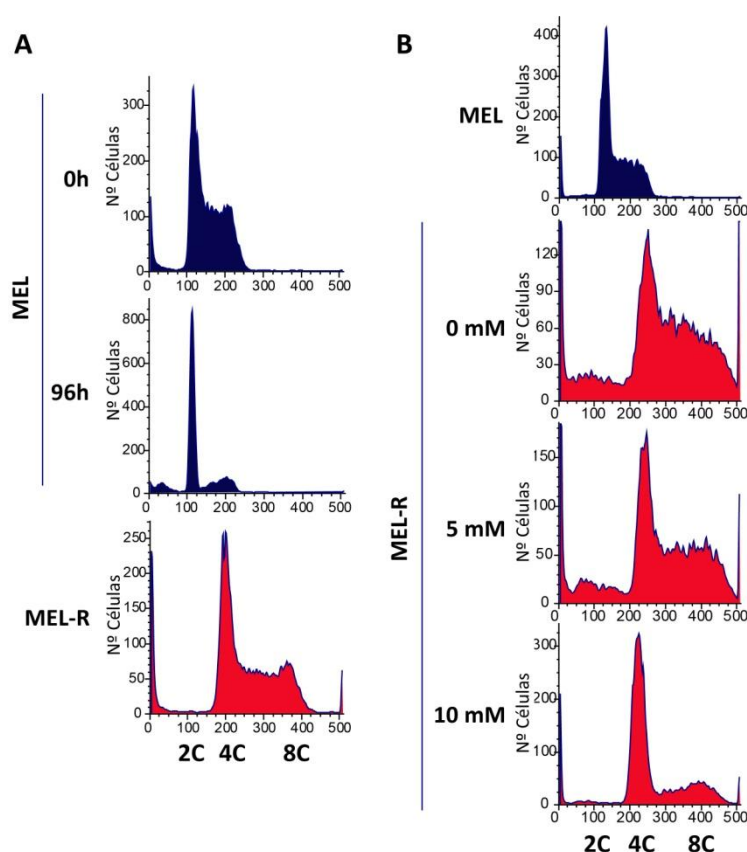


Figura 13. La tetraploidía es una característica de las células resistentes. Se analizó el ciclo celular y la ploidía en MEL-DS19, células diferenciadas con HMBA y MEL-R mediante citometría de flujo A) Las células diferenciadas (96h) y la línea parental (0h) presentan un contenido en ADN diploide. Las células resistentes aumentan el contenido de ADN hasta alcanzar la tetraploidía. B) Se determinó el nivel de ploidía en células resistentes cultivadas con distintas concentraciones de HMBA (0 mM, 5 mM y 10 mM).

4.2. Expresión génica diferencial en MEL-DS19 y MEL-R

4.2.1. Análisis de la expresión génica diferencial en MEL-DS19 y MEL-R mediante ARN-seq

Durante el proceso de diferenciación de las células MEL-DS19 se producen cambios en la expresión génica que provocan la inhibición de la proliferación celular y estimulan el desarrollo de un fenotipo diferenciado (Vanegas et al. 2003; Garcia-Sacristan et al. 2005). Las líneas celulares resistentes MEL-R se comportan de forma distinta a las progenitoras mostrando una incapacidad para retomar el programa de diferenciación en respuesta a los estímulos de los agentes inductores externos. En un intento de explorar cuáles son las causas de la resistencia a la diferenciación llevamos a cabo un análisis de la expresión génica diferencial entre MEL-DS19 y MEL-R mediante técnicas de secuenciación masiva de ARN (ARN-seq).

El protocolo del ARN-seq se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid y los datos fueron posteriormente analizados en el Servicio de Informática del Centro de Investigaciones Biológicas. Se estudiaron muestras duplicadas de ARN mensajero provenientes de células MEL-DS19 sin

diferenciar y células MEL-R considerando lecturas de 25 y 17 millones, respectivamente, con una longitud de 75 nucleótidos. Los datos obtenidos fueron analizados por dos métodos distintos: DESeq (Anders et al. 2012) y Cufflinks-Cuffdiff (Trapnell et al. 2012) obteniendo en ambos casos resultados similares.

Los transcritos procesados mediante Cufflinks, basados en la medida de los FPKM (fragmentos por kilobase del exón por millón de fragmentos mapeados), revelaron 596 genes que se expresan de forma diferencial entre MEL-DS19 y MEL-R, considerando siempre como umbral un *fold-change* mayor de 2 (Figura 14). En el gráfico de la Figura 14A, representado a escala logarítmica, se observa que 486 genes presentan una expresión más elevada en la línea parental respecto a la línea resistente ($FPKM_{MEL} > FPKM_{MEL-R}$) hasta llegar al punto de inflexión, a partir del cual se muestran 110 genes con mayor transcripción en MEL-R respecto a MEL-DS19 ($FPKM_{MEL} < FPKM_{MEL-R}$). El punto de inflexión de la curva corresponde a los valores con un *fold-change* inferior a 2 que fueron eliminados del estudio.

Los niveles de expresión de los 596 genes se representan en un mapa de calor en la Figura 14B. La distribución en el gráfico se realizó en base al análisis de la varianza mínima (Ward 1963). La mayoría de estos genes muestran una elevada transcripción en la línea parental respecto a la resistente corroborando los resultados de la Figura 14A.

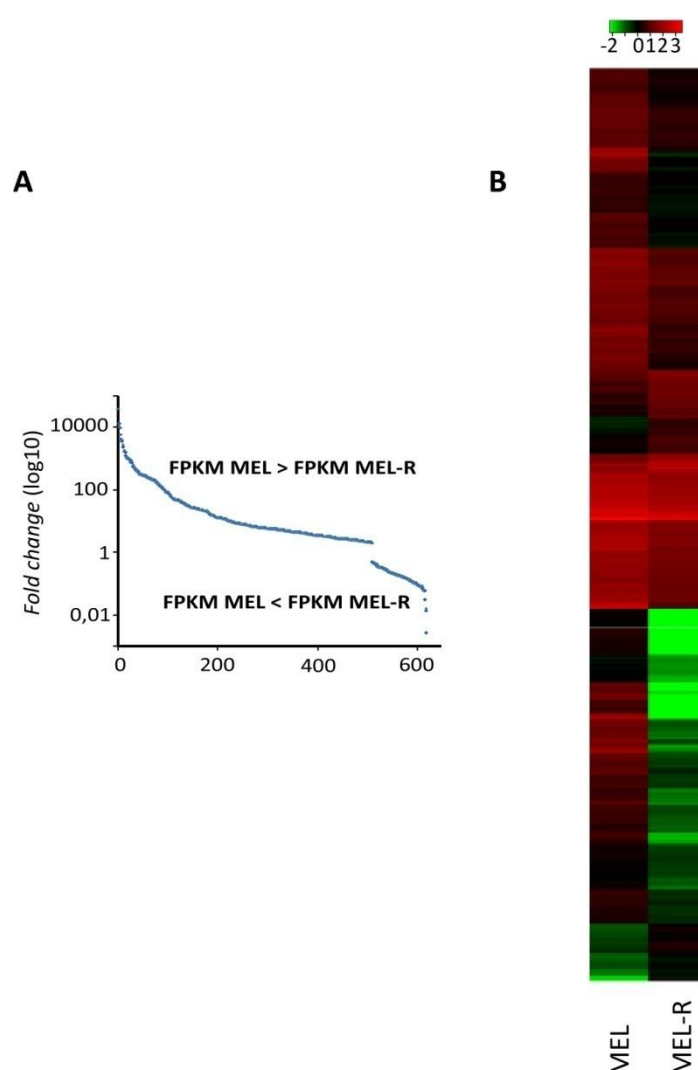


Figura 14. Expresión génica diferencial entre MEL-DS19 y MEL-R analizada mediante ARN-seq. A) Los genes que mostraron diferencias de expresión entre MEL-DS19 y MEL-R se graficaron en función del *fold-change*, representado por el logaritmo de los FPKMs. 486 genes se encuentran más expresados en la línea parental (FPKM MEL > FPKM MEL-R) y 110 genes aumentan su transcripción en la línea resistente (FPKM MEL < FPKM MEL-R). Los valores de *fold change* por debajo de 2 se descartaron del estudio y corresponde al punto de inflexión observado en el gráfico. B) Mapa de calor de los genes que muestran una expresión diferencial entre MEL-DS19 y MEL-R cuya clasificación fue realizada según el análisis de la varianza mínima (Ward 1963). La intensidad de los colores rojo y verde indica mayor o menor nivel de transcripción respectivamente.

4.2.2. Genes con mayor transcripción en MEL-DS19 respecto a MEL-R.

Genes de citoesqueleto de actina

Los resultados obtenidos mediante ARN-seq permitieron determinar la expresión diferencial de 596 genes entre la línea parental MEL-DS19 y la línea resistente MEL-R. En un esfuerzo por analizar los resultados más relevantes

decidimos centrar nuestra atención en genes que muestran mayor expresión en MEL-DS19 respecto a MEL-R, según se muestra en el mapa de calor de la Figura 15. Un ejemplo concreto es la expresión de *Sfpi1/PU.1* que codifica el factor de transcripción PU.1. En base a estudios previos en nuestro y otros laboratorios se sabe que la expresión de PU.1 es elevada en MEL-DS19, pero se encuentra silenciada en MEL-R (Fernandez-Nestosa et al. 2008; Fernandez-Nestosa et al. 2013). La expresión diferencial de PU.1 observada en este estudio permitió validar la tecnología empleada y se utilizó como control positivo de la eficiencia de la técnica.

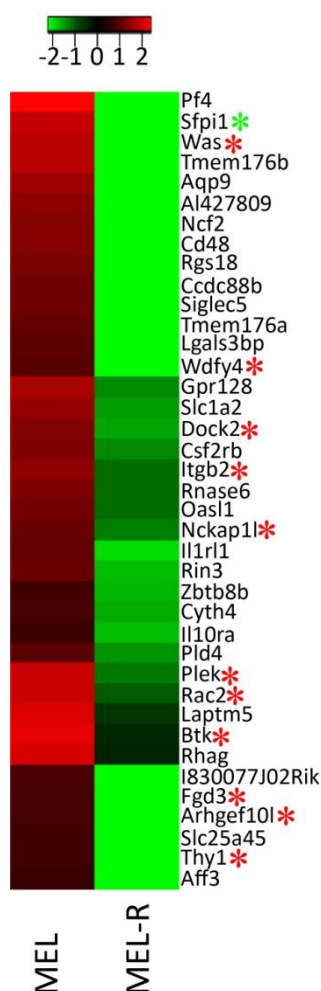


Figura 15. Expresión diferencial de genes con mayor transcripción en la línea parental respecto a la resistente. El mapa de calor muestra un notable porcentaje de genes que desempeñan funciones relacionadas con el citoesqueleto de actina (marcados con asteriscos rojos). Uno de los genes con una elevada expresión en MEL-DS19 respecto a MEL-R es *PU.1/Sfpi1* (asterisco verde) utilizado como control de la eficiencia del ARN-seq. La intensidad de los colores rojo y verde indica mayor o menor nivel de expresión génica respectivamente.

Entre los genes que presentaron una mayor diferencia en la expresión de MEL-DS19 respecto a MEL-R se pudo observar que un número significativo

correspondía a genes implicados en rutas relacionadas con la localización, polimerización y estructura del citoesqueleto de actina.

Con el objeto de validar los resultados obtenidos a nivel de secuenciación masiva se llevó a cabo un análisis individual utilizando PCR a tiempo real. Para ello se tomó en cuenta cada una de las secuencias correspondientes a genes específicos que cumplieran las siguientes condiciones: específico de tejido hematopoyético, relacionado con citoesqueleto de actina, expresión diferencial significativa. Así, se cuantificaron los niveles de transcripción relativa de los genes *Was*, *Plek*, *Arhgef10l*, *Rac2*, *Dock2*, *Btk* y *Nckap1l* (Figura 16). Los patrones de expresión observados en todos los casos validan los datos obtenidos previamente en el ARN-seq, confirmando la ausencia o reducción de la expresión de estos genes en MEL-R respecto a MEL-DS19. Asimismo, se incluyeron en el análisis muestras de células diferenciadas con 5 mM de HMBA o 2% de DMSO recogidas a las 96 horas en presencia de los inductores. Los datos obtenidos indicaron que hay un comportamiento diferencial de expresión, siendo posible discernir entre dos tipos: un primer grupo que incluye *Plek*, *Arhgef10l* y *Nckap1l* cuya actividad es similar a MEL-DS19, aumentando su transcripción respecto a las resistentes y un segundo grupo que comprende *Was*, *Rac2*, *Dock2* y *Btk* que manifiestan una situación inversa, donde las células diferenciadas presentan valores similares a MEL-R. Estos resultados podrían indicar que estos genes participan en rutas celulares diferentes aunque presumiblemente relacionadas con el citoesqueleto de actina.

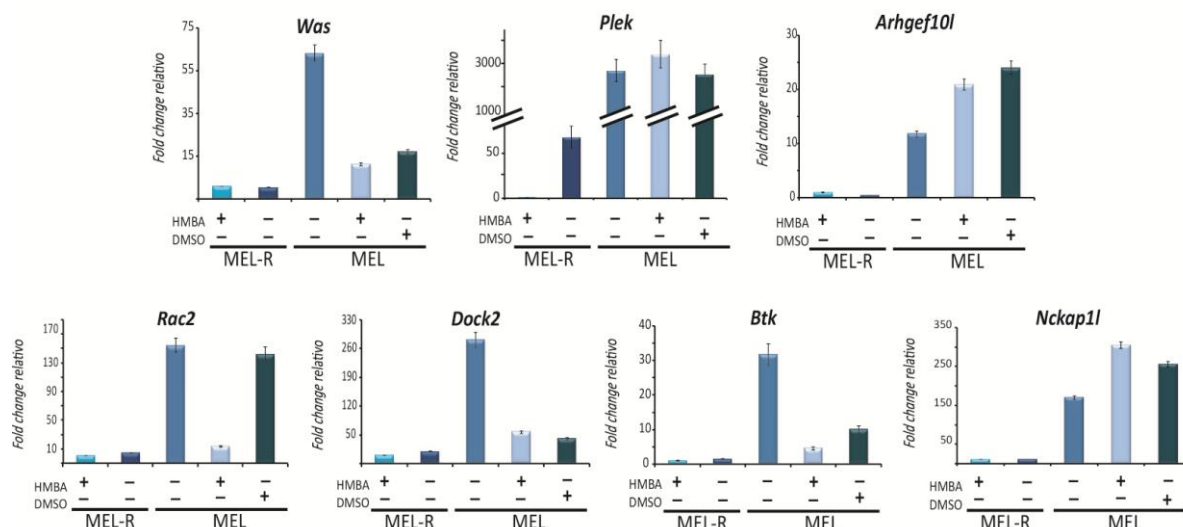


Figura 16. Análisis de la expresión relativa de genes relacionados con el citoesqueleto de actina mediante PCR a tiempo real. La expresión relativa de genes cuya función está relacionada con el citoesqueleto de actina que mostraron una mayor expresión diferencial en la línea parental respecto a la resistente en el ARN-seq se estudiaron mediante una PCR a tiempo real. En el estudio se incluyeron los datos correspondientes a células diferenciadas con HMBA o DMSO recogidas a las 96 horas. La presencia (+) o ausencia (-) de los agentes inductores se indica en cada muestra. Las barras representan las desviaciones estándar de cada triplicado.

4.2.3. Expresión y organización de la actina en células eritroleucémicas

El citoesqueleto de actina está integrado por una gran cantidad de reguladores y nucleadores cuyas interacciones forman una complicada red de proteínas (Lodish 2005). Los resultados descritos en el apartado anterior indicaron que la expresión de muchos de los genes que conforman esta red se encuentra muy reducida en las células resistentes. Con el objeto de detectar defectos o carencias en la ruta de la polimerización de actina en células MEL-R debido al silenciamiento de genes relacionados con su regulación y/o polimerización llevamos a cabo un análisis utilizando técnicas inmunohistoquímicas (Figura 17). La presencia de actina en MEL-DS19 y MEL-R, detectada con un anticuerpo anti- β actina, se observó en forma de anillo localizado en el citoplasma, rodeando los núcleos teñidos con DAPI. Se observó una notable reducción en la intensidad de la señal en las células resistentes lo cual indica que la organización de la actina está seriamente comprometida en la línea resistente (Figura 17A).

Con el objeto de determinar si el decaimiento en la intensidad de la señal de actina se corresponde con los niveles de la proteína se llevó a cabo una cuantificación mediante un *Western blot*. Los resultados obtenidos revelaron valores de actina equivalentes en MEL-DS19 y MEL-R (Figura 17B). Esto llevó a especular que las diferencias observadas entre ambas líneas celulares están relacionadas con la polimerización más que con el contenido total de actina en el citoesqueleto.

Con el fin de comprobar esta hipótesis se analizó la actina globular o G-actina, forma libre representada por monómeros, y actina filamentosa o F-actina, representada por polímeros o microfilamentos, mediante su detección en un *Western blot*. Los resultados obtenidos mostraron valores similares de ambas conformaciones tanto en MEL-DS19 como en MEL-R (Figura 17C). Para validar la eficiencia de la técnica se realizaron experimentos controles mediante tratamientos con citocalasina D, metabolito capaz de unirse a los filamentos de actina impidiendo su polimerización y elongación (Cooper 1987), y con jasplacolinoda que actúa induciendo la polimerización de actina (Bubb et al. 1994) (Figura 17C). En estos casos se vio que tal y como se esperaba, la citocalasina D favorece la acumulación de G-actina en detrimento de la forma filamentosa, mientras que la jasplacolinoda aumenta los niveles de F-actina.

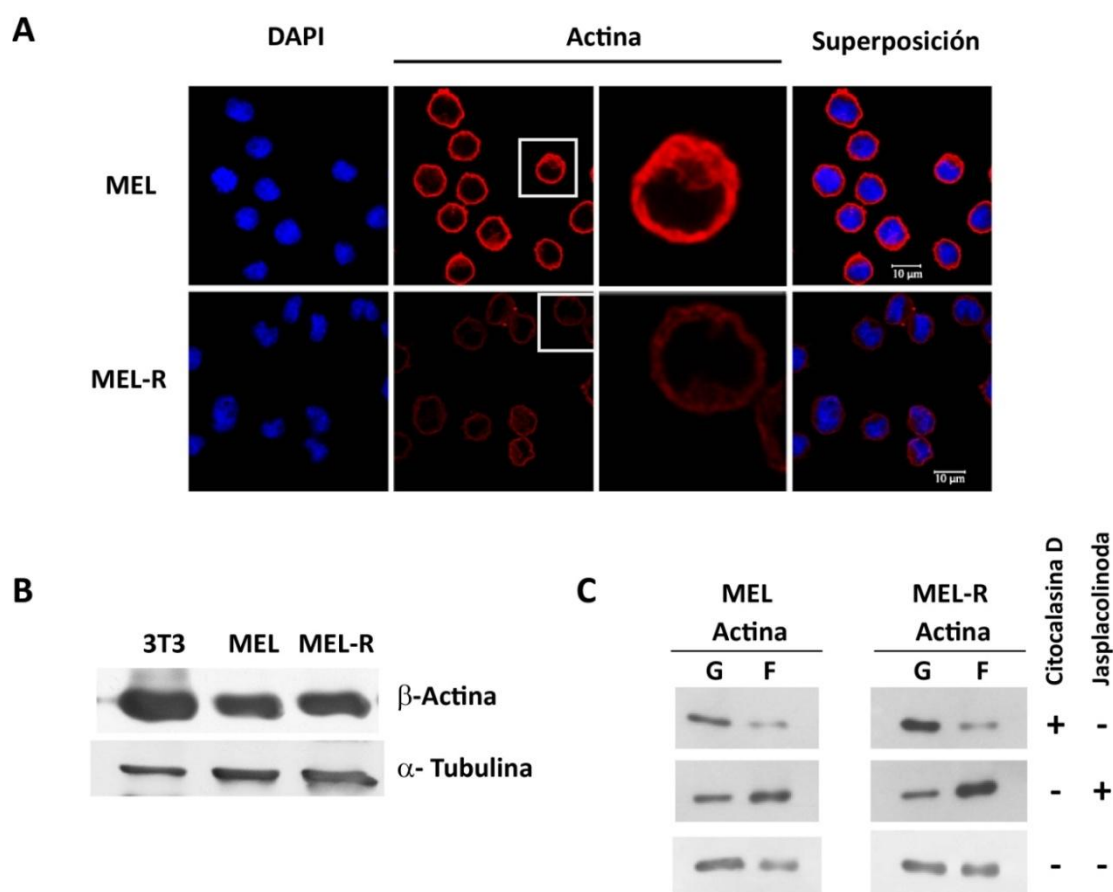


Figura 17. Organización y polimerización de la actina en MEL-DS19 y MEL-R. A) Detección de β -actina en MEL-DS19 y MEL-R mediante inmunofluorescencia. En rojo se muestra la señal correspondiente a la actina mientras que los núcleos teñidos con DAPI dan lugar a la coloración azul. Las fotografías fueron captadas en un microscopio confocal con un objetivo de inmersión 100x y zoom. Barra de escala = 10 μ m. B) Cuantificación de actina mediante *Western blot* en la línea parental MEL-DS19 y en la resistente MEL-R. En el análisis se incluyeron extractos proteicos de fibroblastos 3T3 como control. El control de carga se realizó mediante la inmunodetección de α -tubulina. C) Estudio de la polimerización de actina en MEL-DS19 y MEL-R a partir de la detección de actina monomérica (G-actina) y filamentosa (F-actina) en un *Western blot*. En la línea parental y en la resistente se llevaron a cabo tratamientos con citocalasina D y jasplacolinoda cuya función es impedir o inducir la polimerización de actina, respectivamente.

4.2.4. Genes con mayor transcripción en MEL-R respecto a MEL-DS19.

Genes de histonas

El análisis de los 110 genes con mayor expresión en MEL-R respecto a MEL-DS19 determinó que el 16% correspondían a genes que codifican histonas. La posible implicación de estas proteínas en el bloqueo del proceso de diferenciación celular nos condujo a realizar un estudio más exhaustivo de los mismos.

En la Figura 18A se representa un mapa de calor ampliado, específico de los FPKMs de los genes que codifican las histonas en las líneas celulares MEL-DS19 y

MEL-R. Se puede observar en detalle la variación de expresión entre ambas líneas celulares, representada en función de la intensidad del color, siendo el rojo el de mayor nivel de transcripción. En todos los casos la expresión es más elevada en MEL-R respecto a la línea parental. De los 18 genes de histonas, tres pertenecen a histonas variantes: H3f3b, H2afx y H1f0 cuya expresión diferencial es menor que la observada en las de replicación. El 60% de las histonas de replicación pertenecen a la familia H2B.

Para validar los resultados del ARN-seq se llevó a cabo un análisis cuantitativo mediante la utilización de PCRs a tiempo real (Figura 18B). Los datos obtenidos corroboraron las observaciones realizadas a nivel de secuenciación masiva. En resumen, todos los genes codificantes de histonas analizados aumentan su expresión génica relativa en MEL-R respecto a MEL-DS19 en un rango que va desde más de 10 veces como en el caso de la histona *Hist1h2bk* a 2 veces como en la histona *Hist1h2bj*. El estudio se extendió también a células diferenciadas con HMBA recogidas a las 96 horas de tratamiento. En estos casos el patrón de expresión relativa es similar al observado en MEL-R (Figura 18C). Durante el programa de diferenciación las células incrementan los niveles de histonas, proceso relacionado con un aumento de heterocromatina, dato que coincide con los niveles más elevados de la HP1 α detectados en células diferenciadas y resistentes (Figura 12).

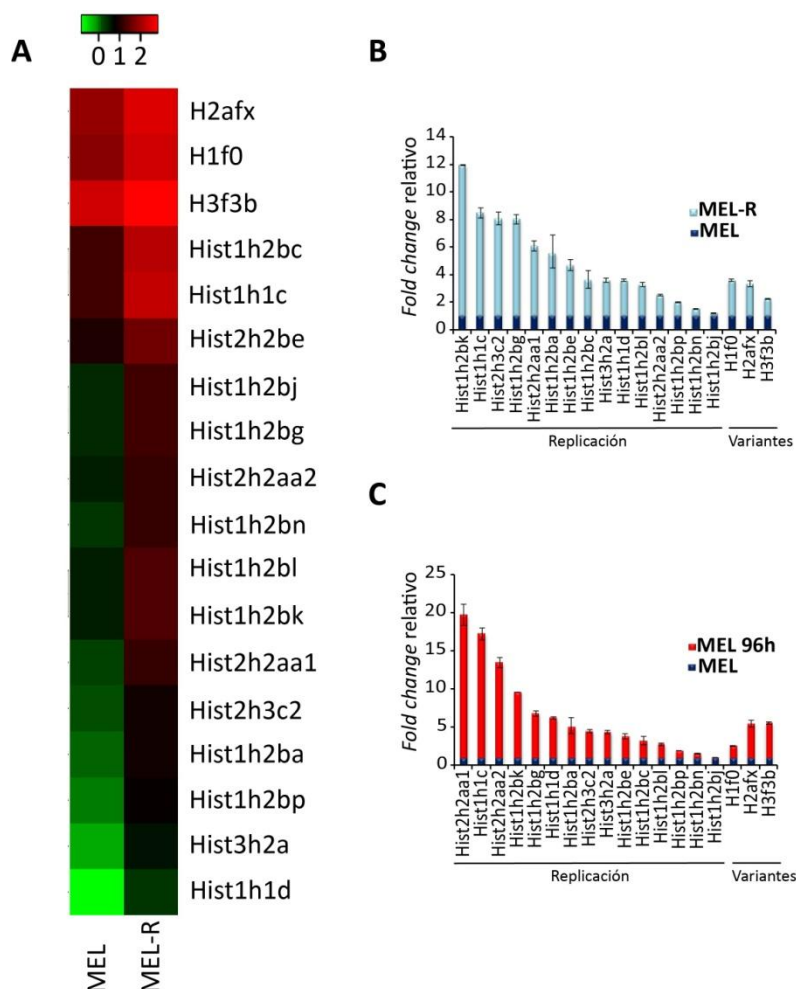


Figura 18. Aumento de la expresión génica de histonas en células resistentes. A) Mapa de calor de la expresión de genes de histonas variantes (H2afx, H1f0 y H3f3b) e histonas de replicación cuya transcripción es más acusada en MEL-R respecto a la línea parental MEL-DS19. La intensidad de los colores rojo y verde indica mayor o menor nivel de transcripción respectivamente. B) Validación mediante PCR a tiempo real de los resultados obtenidos en A). Los valores relativos de la línea parental se representan en color azul oscuro y los correspondientes a las células resistentes se muestran en azul claro. C) El mismo estudio realizado en B) se llevó a cabo en células cuya diferenciación ha sido inducida durante 96 horas con 5 mM de HMBA (representadas en color rojo). Las barras en B) y C) muestran las desviaciones estándar de cada triplicado.

4.2.5. Silenciamiento génico mediado por la metilación de los promotores en células resistentes

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que el silenciamiento de *PU.1/Sfpi1* en MEL-R es causado por la metilación de las islas CpG de su promotor (Fernandez-Nestosa et al. 2013). Con el fin de investigar si el silenciamiento o disminución de la expresión génica observado en las células resistentes es causado por procesos similares se analizó mediante conversión con bisulfito y posterior secuenciación el estado de metilación de los promotores de *Btk*, *Was* y *Plek* en células MEL-DS19 y MEL-R (Figura 19). Se examinaron siete islas

CpG corriente arriba del lugar de inicio de la transcripción de *Btk* y *Was* (Figura 19A y B) y cinco de *Plek* (Figura 19C). Los datos obtenidos mostraron que los sitios CpG 1, 2, 6 y 7 de *Btk*, del 1 al 7 de *Was* y del 1 al 5 de *Plek* de las células resistentes están mayoritariamente hipermetilados mientras que en MEL-DS19, indiferenciadas o diferenciadas, los sitios CpG de los promotores permanecen hipometilados. En el caso de *Btk* no se pudo determinar la metilación de los sitios 3, 4 y 5 debido a que se localizan en una región rica en T-C cuyo enriquecimiento en timinas aumenta al realizar el tratamiento con bisulfito dando lugar a una zona de difícil secuenciación. Estos resultados sugieren que el silenciamiento génico de *Was*, *Plek* y *Btk* en MEL-R se produce, al menos en parte, debido a la metilación de sus promotores.

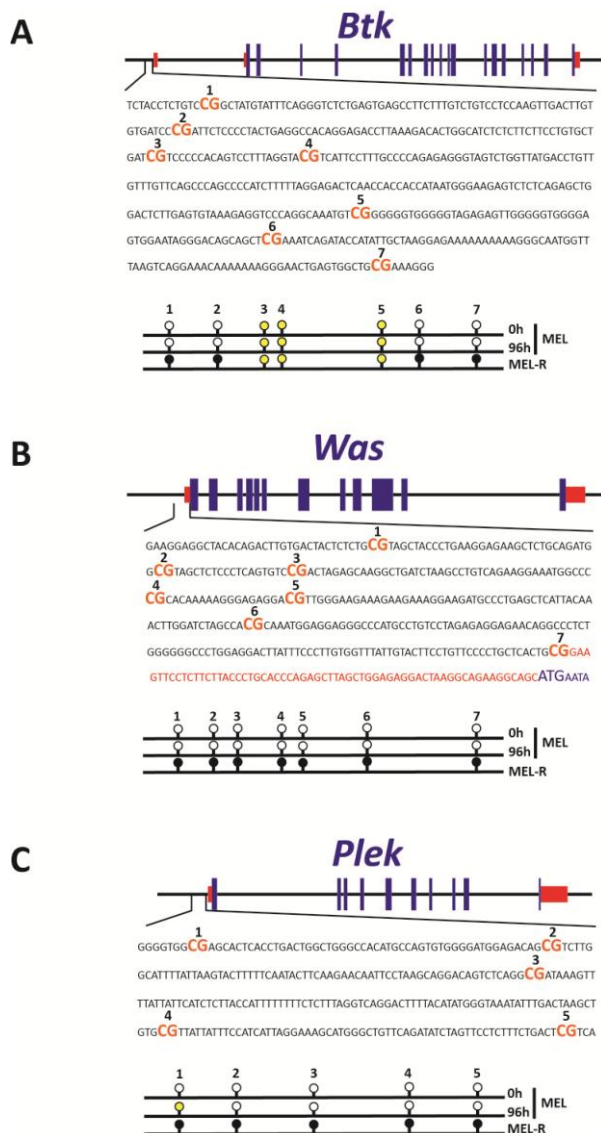


Figura 19. Hipermetilación de las islas CpG en los promotores de *Btk*, *Was* y *Plek* en MEL-R. Mapa genómico de A) *Btk*, B) *Was* y C) *Plek* donde se encuentran representados los exones (rectángulos azules) y el 5' y 3' UTR (rectángulos rojos) de cada gen. En la secuencia del promotor analizada se destacan las islas CpG (CG) en rojo. Se estudió el patrón de metilación de los promotores en células cultivadas con (96h) o sin (0h) HMBA y en células resistentes cuyos resultados se representan en un diagrama. Los círculos negros y blancos muestran islas CpG metiladas o no metiladas respectivamente. Los círculos amarillos indican islas CpG cuyo estado de metilación no ha sido posible determinar.

Según los resultados anteriores se puede deducir que el grado de metilación de los promotores contribuye potencialmente a la regulación de la expresión génica. Esto lleva a indagar si las enzimas responsables de la metilación y demetilación, modulan asimismo su expresión. Se examinaron con este propósito los patrones de expresión de enzimas que catalizan la metilación (Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b) y la demetilación (Tet1, Tet2 y Tet3) del ADN en células MEL-DS19 y MEL-R. Las PCRs a tiempo real revelaron que la metilasa Dnmt1, cuya función es mantener la metilación del ADN, presentó niveles más elevados en MEL-R respecto a MEL-DS19 y a células diferenciadas. Las metilasas “*de novo*” Dnmt3a y Dnmt3b por el contrario no mostraron diferencias. Lo mismo se observó a nivel de las demetilasas Tet1 y Tet2 en donde no se apreciaron disparidades a nivel de expresión (Figura 20). En el caso de Tet3, sin embargo, se detectó una reducción significativa en las células resistentes.

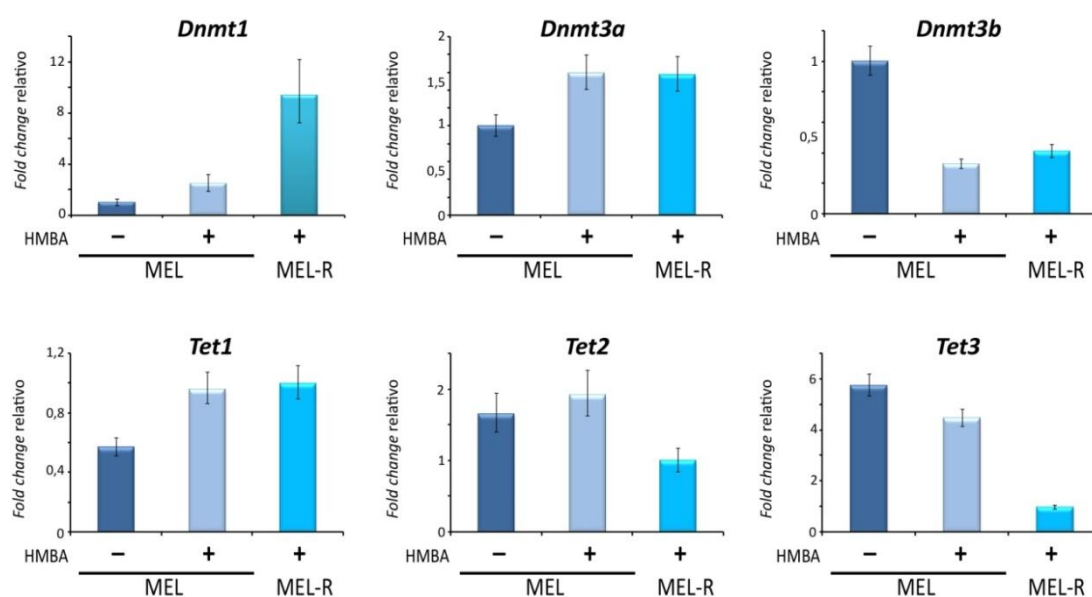


Figura 20. Aumento de la expresión génica relativa de Dnmt1 y Tet3 en células resistentes. Se llevó a cabo el análisis de la expresión génica relativa mediante PCR a tiempo real de las metilasas, tanto de aquellas cuya función es mantener la metilación del ADN (Dnmt1), como de las que realizan una metilación “*de novo*” (Dnmt3a y Dnmt3b). Asimismo, se estudió la transcripción de las enzimas demetilasas Tet1, Tet2 y Tet3. Los niveles de expresión génica se determinaron en células MEL-DS19 con (+) o sin (-) tratar con HMBA 5 mM y en MEL-R. Las barras muestran las desviaciones estándar de cada triplicado.

En conjunto estos resultados sugieren que el silenciamiento génico observado en MEL-R puede estar promovido por dos enzimas que presumiblemente

actuarían de forma sinérgica, aumentando la metilación debido a la actividad de la Dnmt1 y reduciendo la demetilación catalizada por Tet3, probablemente causando el silenciamiento de genes como *Was*, *Plek* y *Btk*.

Según se representa en la Figura 19 la secuenciación con bisulfito permitió determinar que el silenciamiento génico descrito en la línea resistente está asociado, al menos en parte, a la metilación de las islas CpG de los promotores en cada caso. Los datos obtenidos mediante el análisis de ARN-seq y validados con PCRs a tiempo real revelaron que hay una disminución en la transcripción de los genes de histonas en la línea progenitora (Figura 18). Con el fin de determinar si esta disminución está mediada por la metilación de los promotores, tal como ocurre en el caso de *Was*, *Btk* y *Plek*, se analizaron las islas CpG localizadas corriente arriba de los genes *Hist1h2bg*, *Hist1h2bk* e *Hist1h2bp* en MEL-DS19 tratadas (96h) o sin tratar (0h) con HMBA y en MEL-R (Figura 21). Los resultados mostraron que las islas CpG de los segmentos de los promotores de los genes de histonas permanecen mayoritariamente hipometiladas (Figura 21).

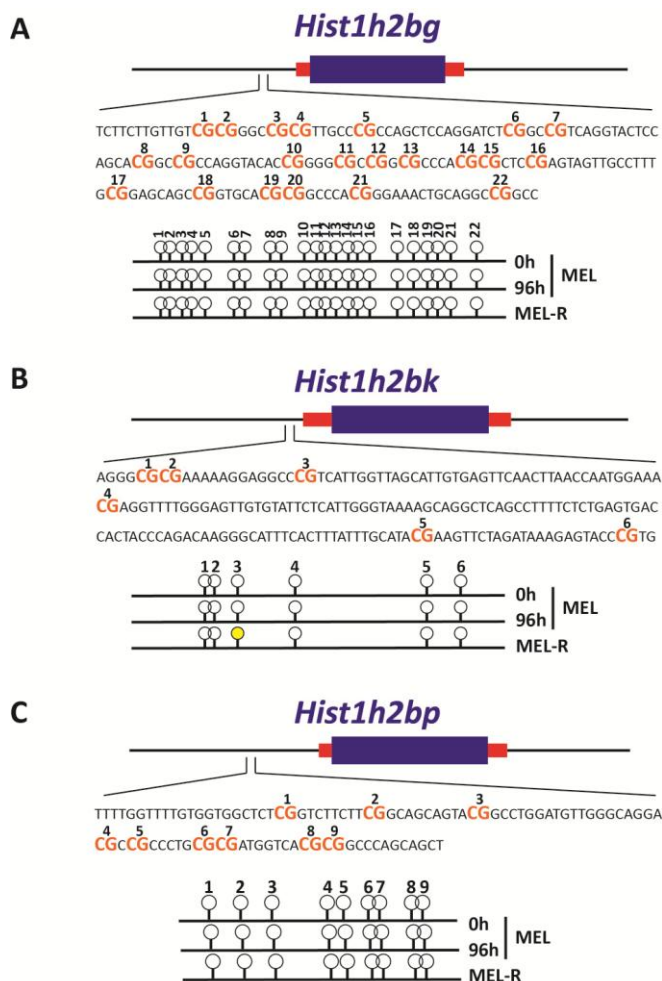


Figura 21. Hipometilación de las islas CpG de los promotores de genes de histonas. Se realizó el estudio del estado de metilación de los promotores de tres genes de histonas A) *Hist1h2bg*, B) *Hist1h2bk* y C) *Hist1h2bp*. En el mapa genómico se muestran los exones representados con rectángulos azules y los 5' y 3' UTR en rojo. Las islas CpG (CG) analizadas se resaltan en rojo. Se estudió el patrón de metilación de los promotores en células cultivadas con (96h) o sin (0h) HMBA y en células resistentes cuyos resultados se describen en un diagrama. Los círculos blancos muestran islas CpGs no metiladas y los amarillos indican un estado de metilación no determinado.

4.3. Estudio de proteínas implicadas en el citoesqueleto de actina: Was, Plek y Btk

Los resultados obtenidos del análisis de la secuenciación masiva o ARN-seq han dejado en evidencia la influencia de un grupo de genes sobre un potencial bloqueo de la diferenciación y consecuentemente de la adquisición de un fenotipo resistente. El silenciamiento o disminución de la expresión de genes cuyas funciones están relacionadas con el citoesqueleto de actina, podría controlar los cambios en la organización de actina en MEL-R inhibiendo la respuesta a los agentes inductores de la diferenciación. *Was*, *Plek* y *Btk* son tres genes pertenecientes a este grupo que presentan una expresión diferencial muy elevada entre MEL-DS19 y MEL-R (Figuras 15 y 16), transcriben de forma específica en el linaje hematopoyético y sus mutaciones producen diversas enfermedades en humanos. Teniendo en cuenta todos estos datos hipotetizamos que estas proteínas podrían ser esenciales en la organización del citoesqueleto de actina y decidimos profundizar en su estudio.

Se analizó la cantidad de proteína total de Plek, Was y Btk mediante un *Western blot* en células MEL-DS19 tratadas (120h) o sin tratar (0h) con HMBA y en MEL-R (Figura 22). Los resultados mostraron un patrón similar para las tres proteínas cuyos niveles se reducen en las células diferenciadas (120h) y es imperceptible en las células resistentes, al igual que en el control negativo de fibroblastos 3T3. Estos datos confirmaron los obtenidos mediante técnicas de análisis de la expresión génica (ARN-seq y PCR a tiempo real) (Figuras 15 y 16).

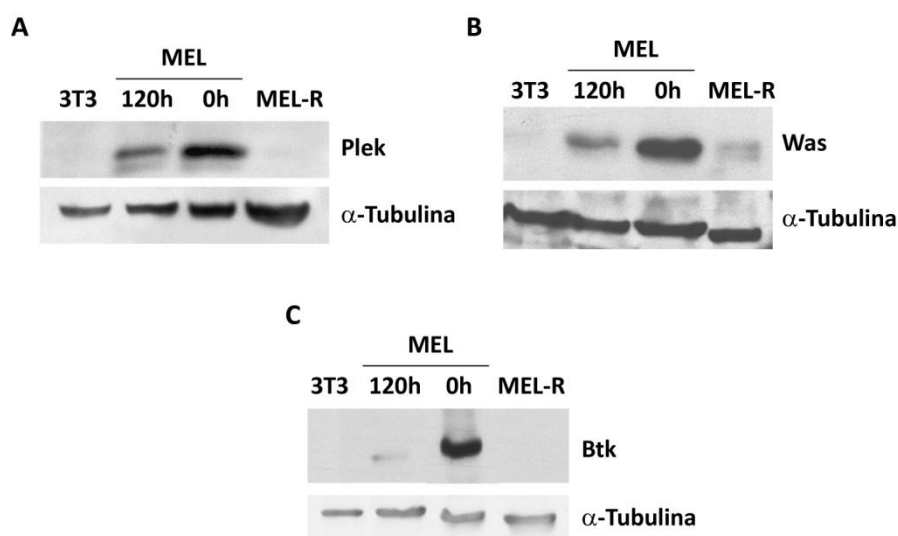


Figura 22. Ausencia de las proteínas Plek, Was y Btk en MEL-R. Cuantificación de la proteína A) Plek, B) Was y C) Btk en células MEL-DS19 tratadas (120h) o no (0h) con HMBA 5 mM y células resistentes mediante *Western blot*. Cantidades similares de proteína de cada muestra se analizaron en una inmunodetección empleando tubulina como control de carga. Se utilizaron extractos proteicos de fibroblastos 3T3 como control negativo.

El análisis de la proteína Btk se completó con un estudio inmunohistoquímico (Figura 23). Los resultados de la inmunofluorescencia mostraron la localización de la proteína en el citoplasma de células MEL-DS19. No se detecta sin embargo en MEL-R, donde tan sólo se aprecian los núcleos teñidos con DAPI. Estos resultados confirmaron la ausencia de Btk en las células resistentes, tal como previamente se demostró en el *Western blot* de la Figura 22C.

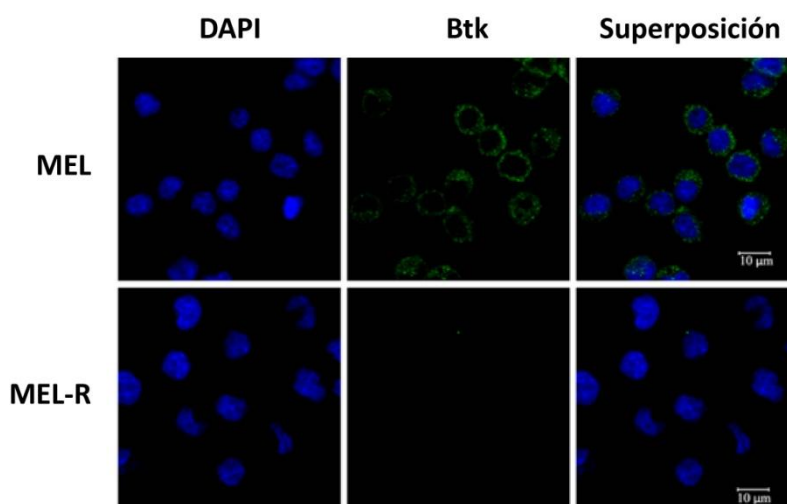


Figura 23. Inmunolocalización de Btk en MEL-DS19 y MEL-R. Detección de la proteína Btk en MEL-DS19 y MEL-R mediante una inmunofluorescencia. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul) mientras que el anti-Btk se conjugó con el anticuerpo secundario Alexa 488 (verde). Las imágenes fueron captadas con un microscopio confocal empleando un objetivo de inmersión 68x. Barra de escala = 10 μm .

En conjunto, estos resultados demostraron que las células resistentes MEL-R no expresan Was, Btk y Plek, proteínas implicadas en el citoesqueleto de actina.

El citoesqueleto participa en la mayoría de funciones esenciales de la célula, incluida la división celular, la morfología, migración, tráfico intracelular y señalización (Mattila et al. 2016). La estructura y regulación del citoesqueleto en células mieloides es esencial para el correcto desarrollo de sus funciones que requieren respuestas rápidas y dinámicas (Liu et al. 2013a; Fine et al. 2016). En el caso de la diferenciación eritroide la importancia del citoesqueleto de actina adquiere aún mayor relevancia, siendo necesario para la enucleación y citoquinesis (Ji et al. 2008; Rivella 2014). Con el objeto de profundizar en el estudio de la función de algunas proteínas implicadas en el citoesqueleto de actina de células eritroleucémicas y averiguar posibles interacciones entre ellas se generaron transfectantes estables en MEL-R que expresan Was, Btk o Plek. Por el contrario, en MEL-DS19 se indujeron deleciones de estos genes basándonos en el sistema CRISPR/Cas9.

Caracterización de Was en células eritroleucémicas

4.3.1. Expresión de Was en la línea celular MEL-R

Was se expresa de forma específica en células hematopoyéticas actuando como el principal factor de nucleación de actina y regulador la polimerización del citoesqueleto a través del complejo Arp2/3 (Campellone and Welch 2010; Dovas and Cox 2010; Rodnick-Smith et al. 2016). Nuestros resultados han demostrado que Was está inactivada en la línea resistente MEL-R, silenciamiento génico que se ha puesto de manifiesto mediante ARN-seq y PCR a tiempo real (Figura 15 y 16). Aún cuando la red de factores que intervienen en la polimerización de actina son numerosos y probablemente redundantes, se podría especular con la idea de que el silenciamiento de Was interfiere con la reprogramación de la diferenciación. Es posible por lo tanto, pensar que la sobreexpresión de Was lograría revertir el fenotipo resistente estimulando probablemente la ruta de polimerización de actina. Con el fin de analizar el efecto que produce la expresión ectópica de Was en células resistentes, se transfectaron cultivos de MEL-R con un vector que codifica el ADNc de Was (pcDNA 3.1-+DYK Was), de aquí en adelante denominado MEL-R/Was (+), cuyo mapa se detalla en la Figura 24A. Se establecieron transfectantes estables mediante diluciones seriadas y se comprobaron los niveles de proteína de los clones seleccionados mediante *Western blot* (Figura 24B).

Con el objeto de detectar cambios en los transfectantes se analizó la cinética de crecimiento de los clones 9, 10 y 11 a partir de cultivos en crecimiento exponencial recogiendo alícuotas a intervalos de 24 horas (Figura 24C). Los resultados indicaron que los clones MEL-R/Was (+) manifiestan un tiempo de duplicación similar al control hasta alcanzar la saturación del cultivo.

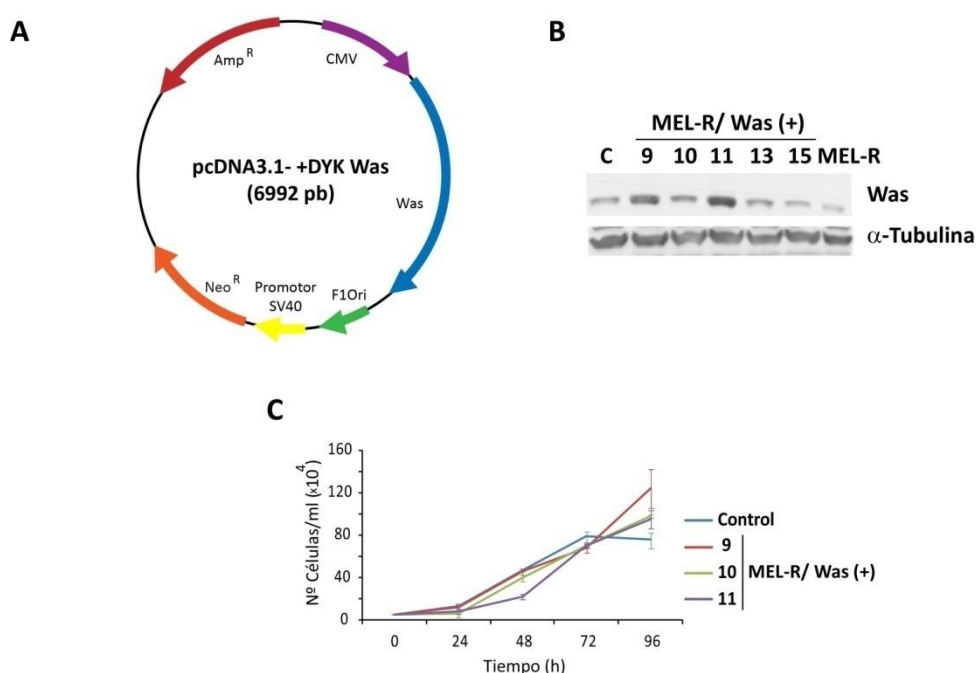


Figura 24. Expresión ectópica de Was en células resistentes. A) Mapa del vector pcDNA3.1-Was empleado en la transfección de MEL-R. B) Cuantificación de Was mediante *Western blot* en los transfectantes MEL-R/Was (+) (9, 10, 11, 13 y 15). En el estudio se incluyeron dos controles negativos: MEL-R sin transfectar (MEL-R) y MEL-R transfectado con el vector vacío (C). Se utilizó la α -tubulina como control de carga. C) Cinética de crecimiento de los clones seleccionados en B) que muestran mayor expresión de Was. Las barras indican la desviación estándar de cada triplicado.

Una de las características fenotípicas MEL-R es su aumento de tamaño celular respecto a la línea parental, tal y como se ha demostrado en apartados anteriores (Figura 11). Varios estudios afirman que los cambios estructurales del citoesqueleto de actina están acompañados de variaciones en el volumen celular. Los cambios en la F-actina afectan al funcionamiento de los transportadores de membrana implicados en la homeostasis del tamaño de la célula (Henson 1999; Pedersen et al. 2001). Con el fin de comprobar si la expresión ectópica de Was induce cambios de tamaño en MEL-R se llevó a cabo un análisis mediante citometría de flujo. Los datos obtenidos indicaron que los clones MEL-R/Was (+) siguen la misma pauta que MEL-R lo cual señala que la sobreexpresión de Was no induce cambios en la morfología celular de las líneas resistentes (Figura 25).

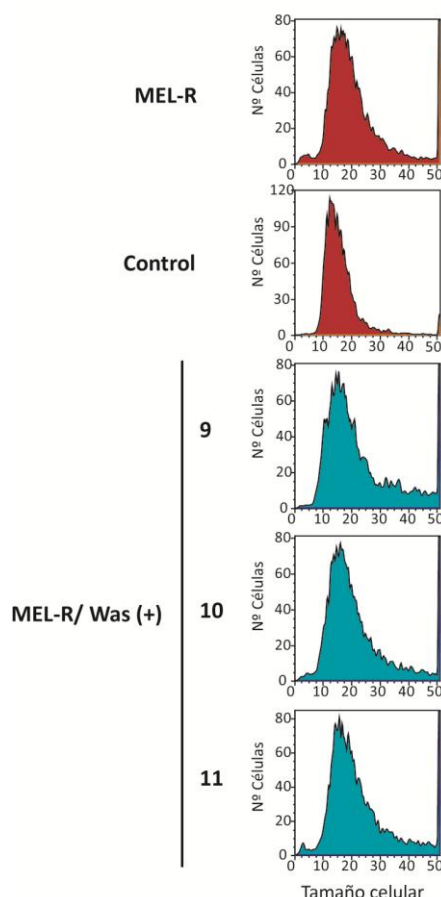


Figura 25. Tamaño celular de transfectantes MEL-R que expresan Was ectópicamente. El tamaño celular de los clones 9, 10 y 11 de MEL-R que sobreexpresan Was se determinó mediante citometría de flujo. Los controles empleados en el estudio se encuentran representados en rojo (MEL-R sin transfectar y el control transfectado con el vector vacío).

4.3.2. La expresión de Was induce la reorganización del citoesqueleto de actina en MEL-R

Con el objeto de analizar la organización, localización y polimerización del citoesqueleto de actina en MEL-R/Was (+) se llevó a cabo un análisis de la proteína mediante técnicas inmunohistoquímicas. Se analizó la distribución de la actina en el citoplasma de los clones 9, 10 y 11 que en todos los casos se manifiesta en forma de anillo alrededor del núcleo (Figura 26A). Se pudo observar asimismo que la intensidad de la señal es mayor en MEL-R/Was (+) en relación a MEL-R, especialmente en el transfectante 10, alcanzando valores cercanos a los observados en MEL-DS19. Con el objeto de determinar si la señal observada se correspondía con la cantidad de actina total se llevó a cabo un *Western blot* (Figura 26B). En todos los casos los niveles de proteína fueron similares, lo cual indicó que la expresión ectópica de Was en células resistentes incide mayoritariamente en la organización de la proteína más que en la cantidad total de actina.

Paralelamente, se analizó el estado de polimerización del citoesqueleto de actina de los transfectantes MEL-R/Was (+), MEL-DS19 y MEL-R cuantificando los niveles de la forma globular (G) y filamentosa (F) de la actina. Se observó un aumento muy pronunciado de la actina filamentosa (F) en los clones MEL-R/Was (+) 9, 10 y 11 respecto a las células MEL-R y MEL-DS19, mientras que la forma globular permanece constante en todas las situaciones (Figura 26C). La mayor presencia de la forma filamentosa apunta a que la polimerización del citoesqueleto de actina se encuentra favorecida en presencia de Was. En conjunto, los resultados indican que la expresión ectópica de Was en las células resistentes induce cambios en la organización de actina y permite especular con una posible relación entre la ausencia de Was en MEL-R y la desorganización del citoesqueleto observada en esta línea celular (Figura 17).

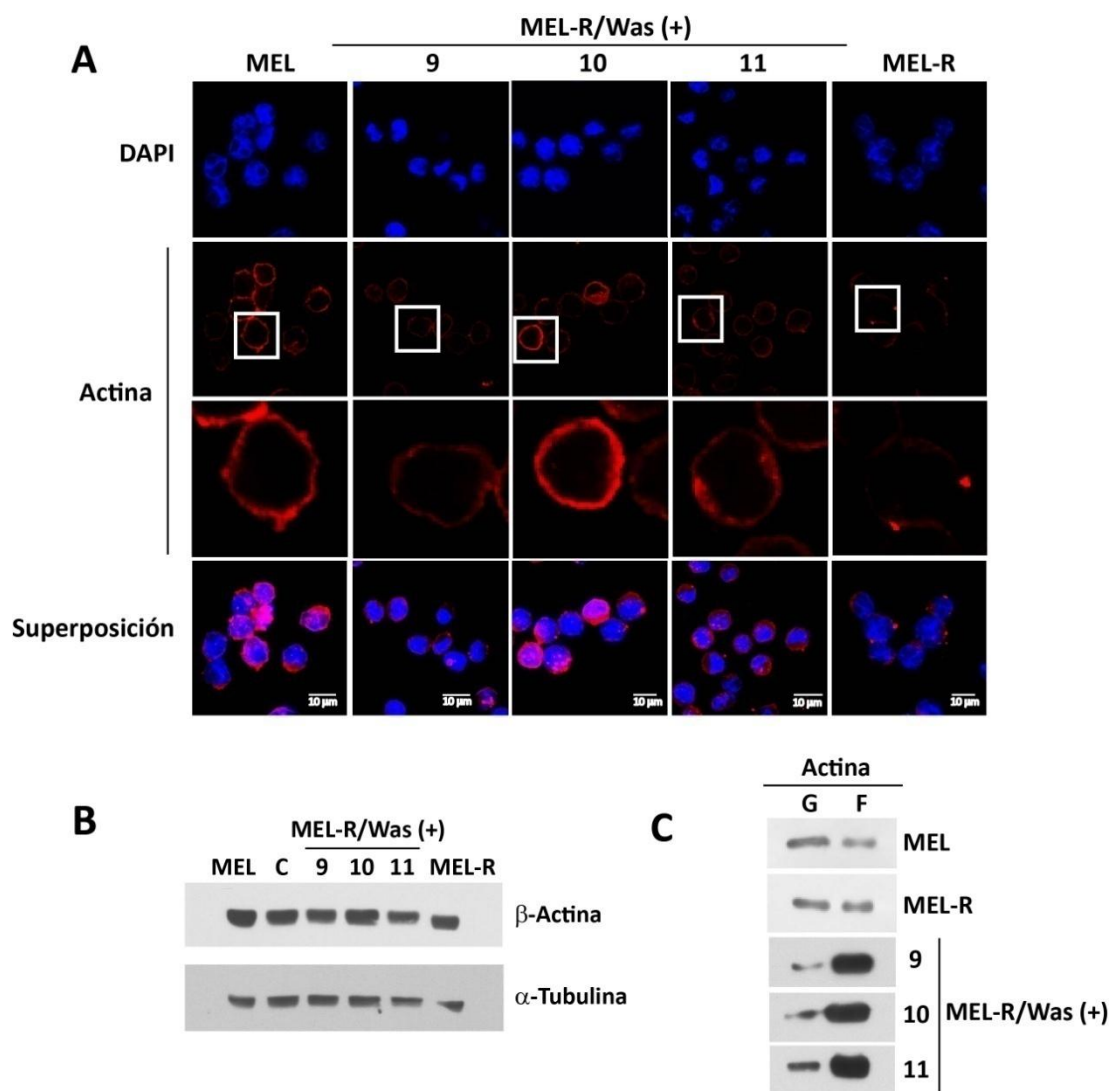


Figura 26. Organización y polimerización de la actina en transfectantes MEL-R que expresan Was de forma ectópica. A) Inmunodetección de la β -actina en MEL-R/Was (+), clones 9, 10 y 11. En el estudio se incluyó el análisis de la actina en la línea parental (MEL-DS19) y en la resistente (MEL-R). En rojo se observa la señal correspondiente a la actina y en azul los núcleos teñidos con DAPI. Las imágenes fueron captadas en un microscopio confocal con un objetivo de inmersión 100x y zoom. Se seleccionó una célula de cada muestra de la segunda fila (recuadro blanco) cuya imagen fue ampliada en la tercera fila. Barra de escala = 10 μ m. B) Cuantificación de la proteína actina mediante *Western blot* en los clones MEL-R/Was (+), MEL-DS19 y MEL-R como controles de la técnica. El control de carga se realizó mediante la inmunodetección de α -tubulina. C) Estudio de la polimerización de actina a partir de la detección de actina monomérica (G-actina) y filamentosa (F-actina) en un *Western blot*.

4.3.3. Deleción de Was en células MEL-DS19 basado en el sistema CRISPR/Cas9

La expresión ectópica de Was en células MEL-R descritos en el apartado anterior permitieron concluir que la sobreexpresión de Was modifica y en parte revierte algunas características del fenotipo resistente. De forma análoga, se intentó dilucidar qué efectos produciría la deleción de Was en cultivos de células

progenitoras MEL-DS19. Con tal propósito se llevó a cabo la delección bialélica de una región del genoma de 9,5 kpb que comprende el gen completo de *Was* localizado en el cromosoma X:7658591-7667617 de ratón (desde el segmento -497 a +9.006) basándonos en el sistema CRISPR/Cas9 (Figura 27). Se transfectaron células MEL-DS19 con los vectores pX330-Was 1 y pX330-Was 2 que contienen la secuencia ARNs_g 1 y 2, respectivamente. Se co-transfectó con un tercer vector conteniendo la secuencia codificante de la proteína GFP que permitió separar clones por *cell sorting* (ver Materiales y Métodos).

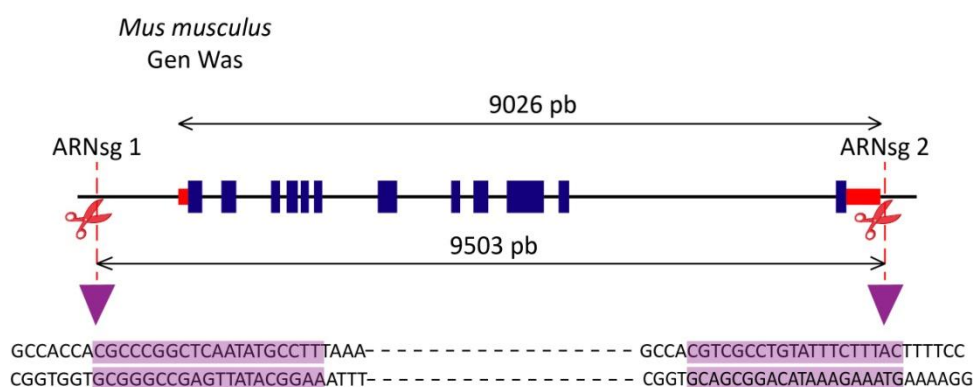


Figura 27. Esquema de la región delecionada del gen *Was* en MEL-DS19. Mapa genómico del gen *Was*. Los exones se representan con rectángulos azules y las regiones 5' y 3' UTR con rectángulos rojos. En morado se destacan las secuencias del genoma que reconoce la endonucleasa Cas9. Las líneas discontinuas rojas indican las regiones (ARNs_g 1 y ARNs_g 2) donde la endonucleasa Cas9 provoca su escisión.

Se analizaron 222 clones de los cuales se seleccionaron los clones 1 y 73 conteniendo delecciones bialélicas según los resultados de la amplificación por PCR con parejas de oligonucleótidos de delección (D) y no delección (ND) (Figura 28A). Para corroborar la delección de *Was* se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la proteína mediante *Western blot* confirmando la expresión en el control MEL-DS19, y la ausencia en el transfectante, de aquí en adelante MEL/*Was*^{-/-} (Figura 28B).

Se realizó una última verificación empleando una amplificación por PCR con una pareja de oligonucleótidos que anillan en la región correspondiente al exón 9 del ARNm de *Was*. Los productos de PCR indicaron la ausencia de transcripción en MEL/*Was*^{-/-} y MEL-R, al contrario de la actividad génica en MEL-DS19 (Figura 28C).

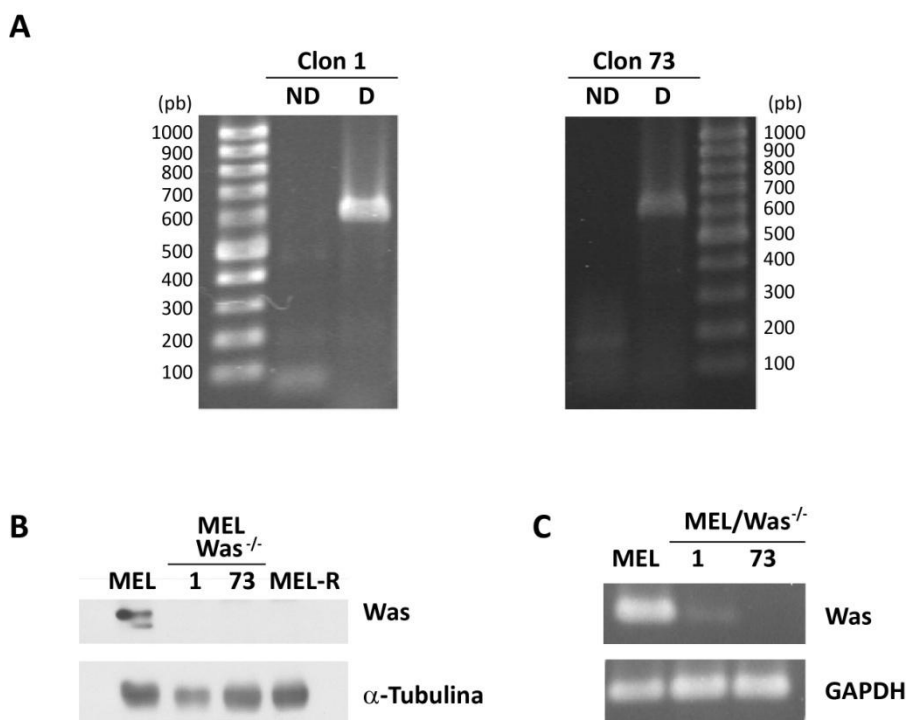


Figura 28. Selección de clones con delección bialélica de *Was* en la línea parental MEL-DS19. A) Análisis de los productos de PCR realizadas con las parejas de oligonucleótidos de no delección (ND) y de delección (D) en los transfectantes 1 y 73 de MEL-DS19. B) Estudio de la traducción de *Was* a partir de extractos proteicos de los clones MEL/*Was*^{-/-} 1 y 73. Se incluyeron muestras de MEL-DS19 y MEL-R como control positivo y negativo, respectivamente. La α -tubulina se empleó como control de carga. C) Productos de PCR de MEL/*Was*^{-/-} 1 y 73 y del control MEL-DS19. La amplificación de los fragmentos se llevó a cabo con una pareja de oligonucleótidos que se anillan en una región específica del exón 9 del ARNm de *Was*. La PCR con los oligonucleótidos correspondientes a GAPDH se utilizó como control.

Con el fin de caracterizar fenotípicamente los clones conteniendo la delección de *Was*, se analizaron algunos parámetros básicos como la duración del ciclo celular, el tamaño celular y la capacidad de diferenciación. Se analizaron alícuotas de cultivos en crecimiento exponencial, recogidas durante cuatro días a intervalos de 24 horas. Se comprobó que la delección de *Was* induce un retraso en la cinética de crecimiento de los clones 1 y 73, alcanzando valores próximos a las 18 horas (Figura 29A). Estos resultados determinan que la ausencia de *Was* en células eritroleucémicas disminuye parcialmente la capacidad proliferativa.

Otro de los parámetros analizados fue el potencial de los clones para reiniciar el programa de diferenciación celular en ausencia de *Was*. Se trataron cultivos de MEL/*Was*^{-/-} con 5 mM HMBA y se analizó el porcentaje de células diferenciadas. Los resultados demostraron que a los 4 días de tratamiento el porcentaje de células diferenciadas se encuentra en un 90-93% en MEL/*Was*^{-/-} 1 y

MEL-DS19, aunque se percibe un pequeño aumento, aproximadamente el 30%, de células indiferenciadas en el clon 73 (Figura 29B). Estos datos indicaron que la ausencia de Was no interfiere significativamente en el bloqueo de la diferenciación de células eritroleucémicas.

El análisis del tamaño celular de MEL/Was^{-/-} permitió llegar a conclusiones similares (Figura 29C). Se analizaron muestras por citometría de flujo observándose un volumen celular similar tanto en los transfectantes como en los progenitores. Estos resultados indicaron que la delección de Was en MEL-DS19 no afecta al tamaño celular.

Todos estos resultados indicaron que la ausencia de Was en MEL DS19, si bien provocan un leve retraso en el ciclo celular, no inciden significativamente en otros parámetros característicos del fenotipo resistente.

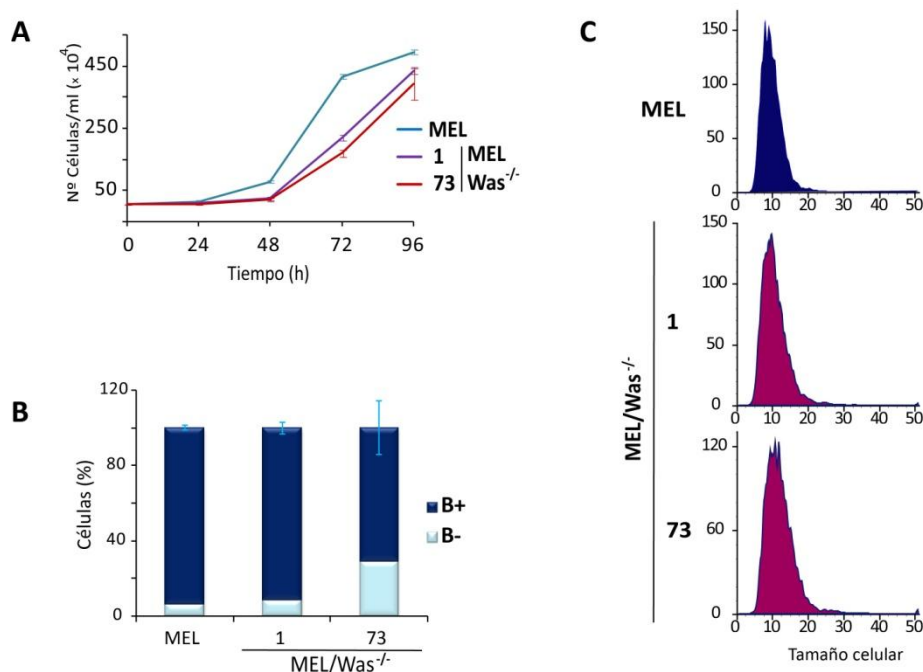


Figura 29. Cinética de crecimiento, diferenciación y tamaño celular en transfectantes Was^{-/-}. A) Curva de crecimiento celular de MEL/Was^{-/-} 1 y 73. Se contabilizaron muestras por triplicado cada 24 horas durante 4 días. B) Efecto de la delección de Was sobre la diferenciación celular en células tratadas con 5mM HMBA durante 96h. Se contabilizó el porcentaje de células benzidina positivas (B+), representadas en azul oscuro. Las barras en A) y B) muestran las desviaciones estándar de cada muestra por triplicado. C) Determinación del tamaño celular MEL/Was^{-/-} 1 y 73 y MEL-DS19 mediante citometría de flujo.

4.3.4. Efecto de la inhibición de Was sobre el citoesqueleto de actina en células MEL-DS19

Was participa en una de las principales rutas de polimerización de actina mediante la unión al complejo Arp2/3 en células hematopoyéticas. Para comprobar si la ausencia de Was obstaculiza o neutraliza la expresión de actina se analizaron los clones 1 y 73 de MEL/Was^{-/-}, MEL-DS19 y MEL-R mediante inmunofluorescencia (Figura 30A). Los resultados revelaron que la distribución de la actina es semejante en todas las muestras aunque la intensidad de la señal disminuye en los transfectantes MEL/Was^{-/-} 1 (-) y 73 (-). Paralelamente, se comprobó si el fenotipo observado revertía al expresar de nuevo la proteína Was mediante transfecciones transitorias con el vector de expresión pcDNA 3.1-Was, cuyo mapa se detalló en la Figura 24. Las muestras se recogieron a las 48 horas después de la transfección observándose la recuperación de la señal de actina en MEL/Was^{-/-} 1 (+) y 73 (+) respecto a los clones originales, alcanzando niveles próximos a los de MEL-DS19, especialmente en el clon MEL/Was^{-/-} 1 (+). Estos resultados indicaron que la delección de Was en células eritroleucémicas induce la remodelación del citoesqueleto de actina cuyo fenotipo revierte cuando se expresa de nuevo la proteína *Wiskott-Aldrich syndrome*. A pesar de las fluctuaciones que se observan a nivel de inmunofluorescencia la cantidad total de actina no está afectada (Figura 30B).

Para comprobar el estado de los filamentos de actina se analizó la cantidad de actina globular (G-actina) y filamentosa (F-actina) de los transfectantes (Figura 30C). Se observó una reducción drástica de los niveles de F-actina en las muestras que carecen de Was (clones 1 y 73) al mismo tiempo que una acumulación de la forma globular (G). Estos datos confirmaron las diferencias detectadas en la inmunolocalización de la actina donde se intuye la desorganización y reducción de la polimerización del citoesqueleto en los clones donde se ha delecionado *Was*.

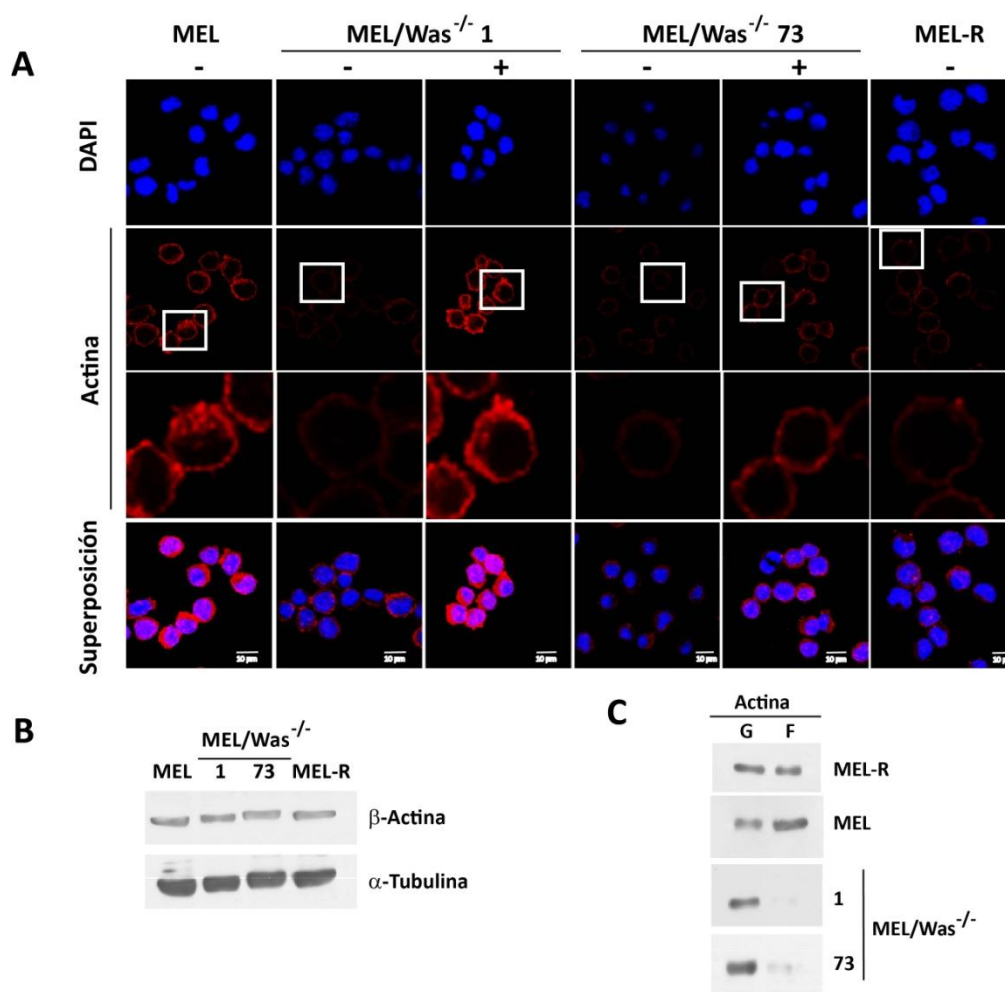


Figura 30. La ausencia de Was en MEL-DS19 provoca defectos en la polimerización y organización del citoesqueleto de actina. A) Se determinó la organización de la actina mediante una inmunolocalización de la proteína en los transfectantes 1 y 73 de MEL/Was^{-/-} a los que se les ha inducido (+) o no (-) la expresión ectópica de Was. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI mientras que la señal correspondiente a la β -actina aparece en rojo. Las imágenes se tomaron en un microscopio confocal con un objetivo 100x y zoom. En la segunda fila se seleccionó una célula de cada muestra (recuadro blanco) cuya imagen se encuentra ampliada en la tercera fila. Barra de escala = 10 μ m. B) Expresión de actina analizadas mediante un *Western blot* C) Detección de G- y F-actina en un *Western blot* en los clones MEL/Was^{-/-} 1 y 73.

En conjunto, estos resultados demuestran que la ausencia de Was en MEL-DS19 provoca cambios en la organización y polimerización del citoesqueleto de actina cuyo fenotipo puede ser recuperado forzando la expresión de Was en los transfectantes.

4.3.5. Función de Was como regulador de la transcripción

Varios estudios han demostrado que Was ejerce funciones adicionales a las atribuidas como regulador y nucleador del citoesqueleto de actina, actuando además como modulador transcripcional (Taylor et al. 2010; Looi et al. 2014). Se ha visto que Btk está implicado en la regulación de Was mediante la interacción con los dominios SH3 de la proteína (Cory et al. 2002). Con el objeto de comprobar si Was regula la expresión de Btk en células eritroleucémicas se llevaron a cabo experimentos en los transfectantes que sobreexpresan Was en las líneas resistentes y en células MEL DS19 en donde se ha delecionado el gen. En la Figura 31A se muestran los niveles de Btk en MEL DS19, en los clones en donde se ha delecionado el gen y en las células resistentes. Los resultados indicaron que Btk se expresa en los dos primeros casos pero está silenciado en las células MEL-R. Cuando se analizaron los niveles de Btk en MEL/Was^{-/-}, y en los mismos transfectantes después de expresar ectópicamente Was, MEL/Was^{-/-} (+), se observó que los niveles de Btk no sufrían variaciones. Sin embargo, cuando se sobreexpresó Was en las células resistentes, MEL-R/Was (+), se detectó la presencia de Btk en contraposición a la línea original MEL-R, especialmente en los transfectantes 10 y 11, demostrando que la expresión ectópica de Was produce el desbloqueo del silenciamiento génico de *Btk* (Figura 31B).

Con el fin de corroborar los datos obtenidos en el *Western blot* se realizó una inmunodetección empleando un anticuerpo anti-Btk. En los transfectantes MEL/Was^{-/-} 1 y 73 y en MEL-R/Was (+) 9, 10 y 11 se observó la presencia de Btk en el citoplasma de manera análoga a MEL-DS19. . Por el contrario, no se detectó señal alguna en las células resistentes (Figura 31C). Estos resultados confirman las observaciones anteriores e indican que Was ejerce un papel como regulador de la expresión génica induciendo la transcripción de *Btk*.

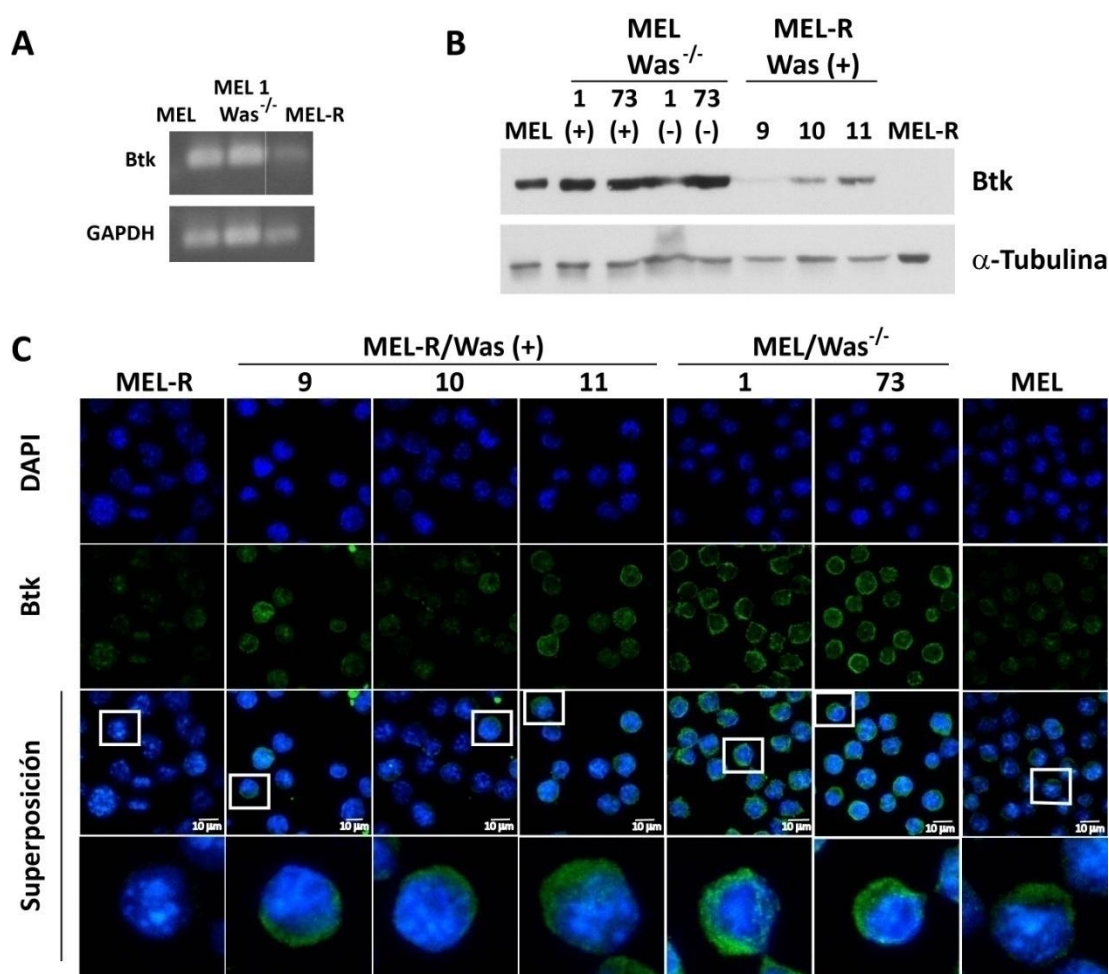


Figura 31. Análisis de la expresión de Btk en clones de delección o de sobreexpresión de Was.

A) Expresión de *Btk* en el clon 1 de MEL/Was^{-/-} mediante amplificación por PCR. GAPDH fue utilizado como control. B) *Western blot* de Btk en los clones MEL/Was^{-/-} a los que posteriormente se les ha inducido (+) o no (-) la expresión ectópica de Was. Se incluyen los resultados correspondientes a los transfectantes MEL-R/Was (+) clones 9, 10 y 11. Se utilizó una muestra de MEL-DS19 y de MEL-R como controles positivo y negativo, respectivamente. La membrana fue incubada con α -tubulina como control de carga. C) Inmunolocalización de Btk (verde) en MEL-R/Was (+) clones 9, 10 y 11 y MEL/Was^{-/-} clones 1 y 73. Los núcleos se tiñeron con DAPI dando lugar a la coloración azul. En los paneles de la tercera fila se seleccionó una célula (recuadro blanco) cuya imagen se encuentra ampliada en los paneles de la cuarta fila. Las fotografías fueron captadas en un microscopio confocal con un objetivo de inmersión 100x y zoom. Barra de escala = 10 μ m.

Caracterización de Btk en células eritroleucémicas

4.3.6. Expresión de Btk en células MEL-R

La proteína Btk es una tirosina quinasa perteneciente a la familia Tec que se expresa tanto en el linaje linfoide como en el mieloide cuya función está relacionada con el desarrollo, diferenciación y señalización celular (Mohamed et al. 2009). Los resultados del ARN-seq demostraron que Btk se expresa en las células eritroleucémicas aunque no en la línea resistente MEL-R (Figuras 15 y 16). Con el

objeto de investigar si el silenciamiento de Btk interfiere en el bloqueo de la diferenciación que soportan las líneas resistentes se llevaron a cabo experimentos de sobreexpresión con transfectantes estables. Utilizando el vector pCMV6-Btk (Figura 32A), se aislaron transfectantes estables y se seleccionaron clones específicos en función de los niveles de proteína detectados. Los clones MEL-R/Btk (+) 1, 2 y 3 son tres de los ejemplos con niveles de tirosina quinasa de Bruton significativos (Figura 32B).

Se llevaron a cabo comparaciones de ciertos parámetros, como la cinética de crecimiento o el tamaño celular, entre los clones y las células MEL-R originales. En el primer caso, se utilizaron cultivos independientes creciendo en fase exponencial y se recogieron alícuotas cada 24 horas. Se observó una proliferación celular similar entre el control y los clones 1 y 2 mientras que el 3 parece tener un ligero retraso en el tiempo de duplicación respecto al resto de muestras (Figura 32C).

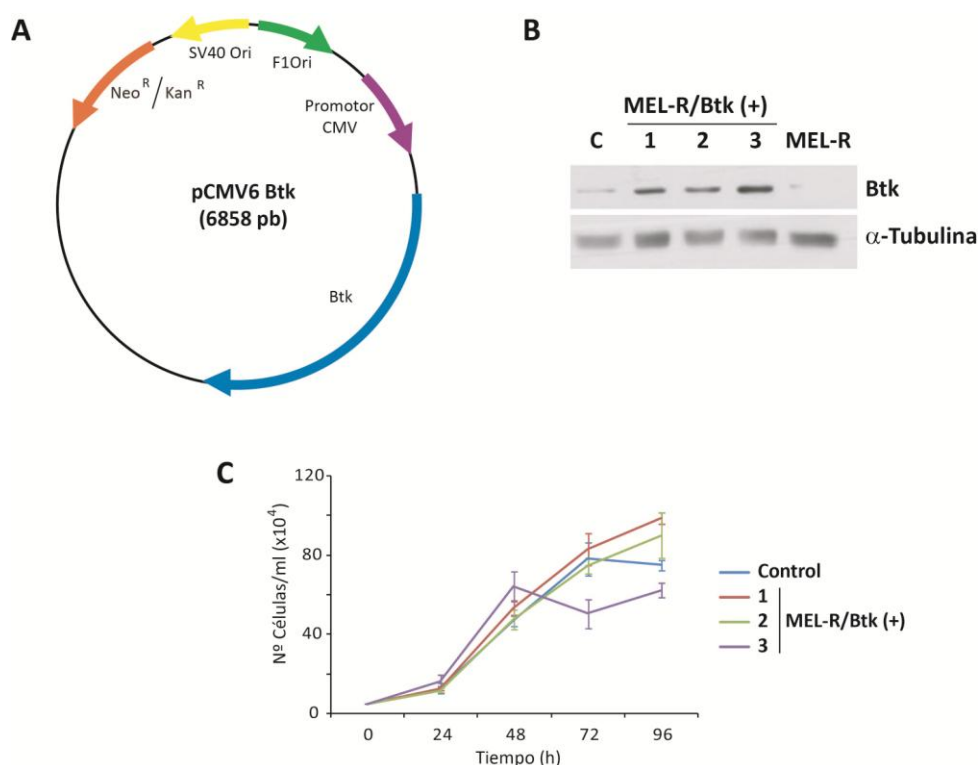


Figura 32. Expresión ectópica de Btk en células resistentes. A) Mapa del vector pCMV6 Btk empleado en la transfección de MEL-R que contiene la secuencia codificadora de Btk. En el esquema se detallan los elementos más importantes del vector. B) Análisis de la expresión ectópica de Btk en los clones de MEL-R (MEL-R/Btk (+)) mediante *Western blot*. En el estudio se incluyeron dos controles negativos: MEL-R sin transfectar (MEL-R) y MEL-R transfectado con el vector vacío (C). La inmunodetección de tubulina se utilizó como control de carga. C) Cinética de crecimiento de los clones MEL-R/Btk (+). Las barras representan la desviación estándar de cada triplicado.

Asimismo, se comprobó que el tamaño celular de los transfectantes MEL-R/Btk (+) no difiere del observado en la línea original MEL-R o el control. Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo revelaron que los clones 1, 2 y 3 de MEL-R/Btk (+) se caracterizan por presentar un volumen similar al de MEL-R (Figura 33).

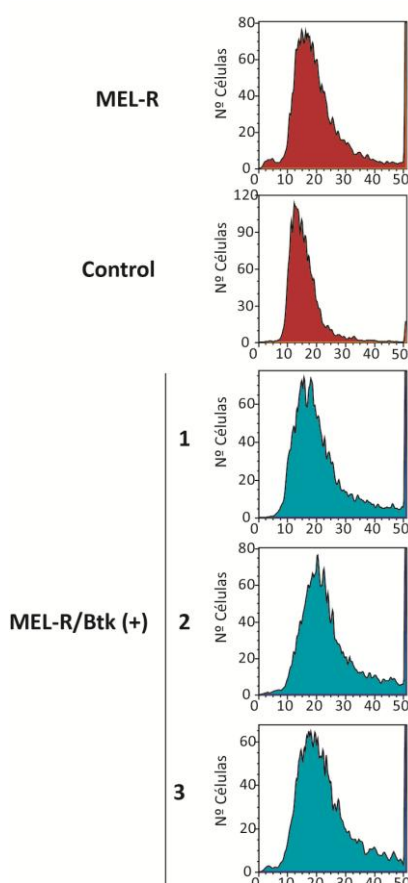


Figura 33. Tamaño celular de transfectantes estables de MEL-R que expresan Btk de forma ectópica. Análisis del tamaño celular mediante citometría de flujo en los clones MEL-R/Btk (+), representados en azul, en MEL-R y en control (MEL-R transfectado con el vector vacío) mostrados en color rojo.

4.3.7. La expresión ectópica de Btk en MEL-R induce cambios en el citoesqueleto de actina

Estudios realizados en células B y plaquetas han demostrado que la activación de Btk induce la reorganización del citoesqueleto de actina (Mukhopadhyay et al. 2001; Liu et al. 2013a) motivo por el cual decidimos estudiar su efecto en células eritroleucémicas. La detección de actina con un anticuerpo anti- β -actina reveló que mientras que la localización es semejante en todos los casos, la intensidad de la fluorescencia es mayor en los transfectantes que sobreexpresan

Btk de forma ectópica, alcanzando niveles similares a los observados en células MEL-DS19 (Figura 34A). Estas diferencias sin embargo, no eran debidas a cambios en los niveles de actina total, según se comprobó mediante *Western blot* (Figura 34B).

Para analizar los posibles efectos de Btk sobre la polimerización de actina se realizaron experimentos separando por sedimentación y posterior análisis en *Western blot* de la forma globular (G) y filamentosa (F) de la proteína. Los resultados indicaron que los clones MEL-R/Btk (+) contienen cantidades de F-actina ligeramente inferiores a las observadas en MEL-R, especialmente en el caso de los clones 1 y 2 (Figura 34C). Estos datos sugieren que, al igual que ocurría con Was, Btk favorece la organización y remodelación del citoesqueleto de actina en células eritroleucémicas.

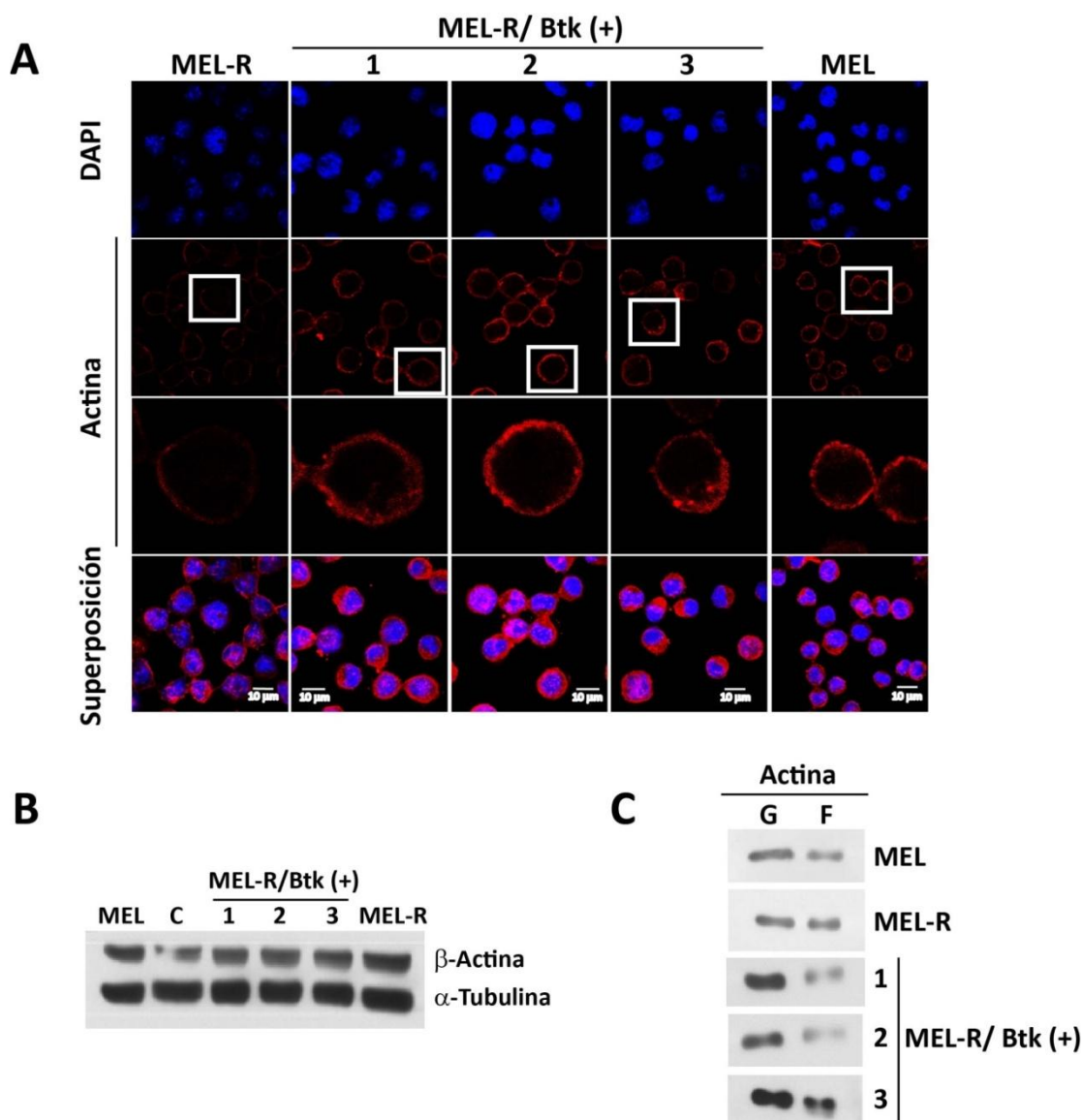


Figura 34. Organización y polimerización de la actina en clones de MEL-R que expresan Btk ectópicamente. A) Inmunodetección de la β -actina en MEL-R/Btk (+), clones 1, 2 y 3, MEL-R y MEL-DS19. La señal correspondiente a la actina se observa en rojo y los núcleos se muestran en azul teñidos con DAPI. Las imágenes fueron captadas mediante un microscopio confocal con un objetivo de inmersión 100x y zoom. En los paneles de la segunda fila se seleccionó una célula de cada muestra cuya imagen se encuentra ampliada en los paneles de la tercera fila. Barra de escala = 10 μ m. B) Cuantificación de la actina mediante *Western blots* en los clones MEL-R/Btk (+), MEL-DS19 y MEL-R. El control (C) corresponde a MEL-R transfectado con el vector vacío. El control de carga se realizó mediante la inmunodetección de α -tubulina. C) Estudio de la polimerización de actina a partir de la observación de actina monomérica (G-actina) y filamentosa (F-actina) en una inmunodetección.

4.3.8. Deleción de Btk en células MEL-DS19 basado en el sistema CRISPR/Cas9

Con el fin de estudiar la función de la tirosina quinasa de Bruton (Btk) en células MEL-DS19 y analizar los posibles efectos que tendría su silenciamiento se establecieron líneas estables deficientes en Btk. Para esto, se llevó a cabo una

deleción de 5,8 Kpb de una región del genoma que incluye los tres primeros exones del gen *Btk* localizado en el cromosoma X:131076879-131117679 de ratón (desde el segmento -300 a +5.549) empleando la técnica CRISPR/Cas9 (Figura 35). Se transfectaron células MEL-DS19 con los vectores pX330-Btk 1 y pX330-Btk 2 que contienen la secuencia ARNsrg 1 y 2, respectivamente.

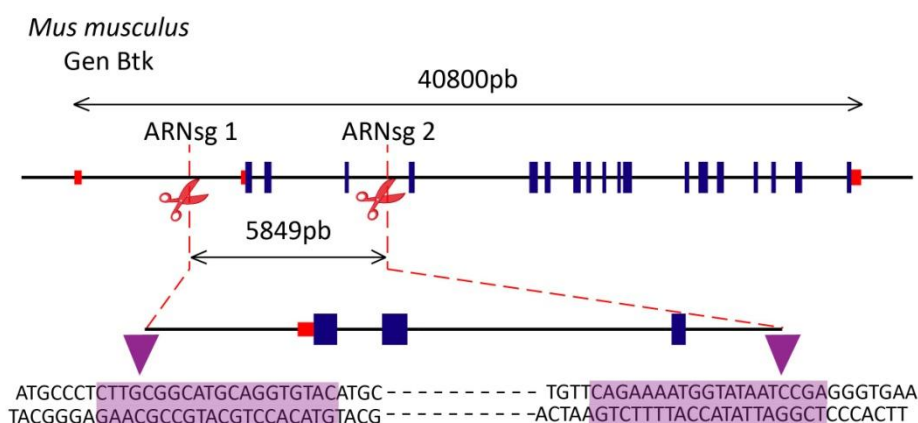


Figura 35. Esquema de la región delecionada del gen *Btk* en MEL-DS19. Mapa genómico del gen *Btk* en el que se indujo una deleción de 5,8 Kpb. Los exones se representan con rectángulos azules y el 5' y 3' UTR con rectángulos rojos. En morado se destacan las secuencias del genoma que reconoce la endonucleasa. Las líneas discontinuas rojas indican las regiones (ARNsrg 1 y ARNsrg 2) donde la endonucleasa Cas9 provoca su escisión.

Se co-transfectó además con un vector capaz de expresar la proteína GFP que permitió separar clones por *cell sorting* (ver Materiales y Métodos). De un total de 150 clones analizados se aisló el clon 41 cuya deleción bialélica se comprobó amplificando por PCR con la pareja de oligonucleótidos de deleción (D) y no deleción (ND) (Figura 36A). Un análisis por *Western blot* confirmó la ausencia de Btk en MEL/Btk^{-/-} (Figura 36B).

Con frecuencia se producen inserciones y/o deleciones durante el proceso de reparación por recombinación no homóloga en la región del genoma donde se produce la escisión mediante el sistema CRISPR/Cas9 (Bauer et al. 2015). Durante la comprobación de la deleción del clon 41 se detectó una inserción de 9 pb (Figura 36C).

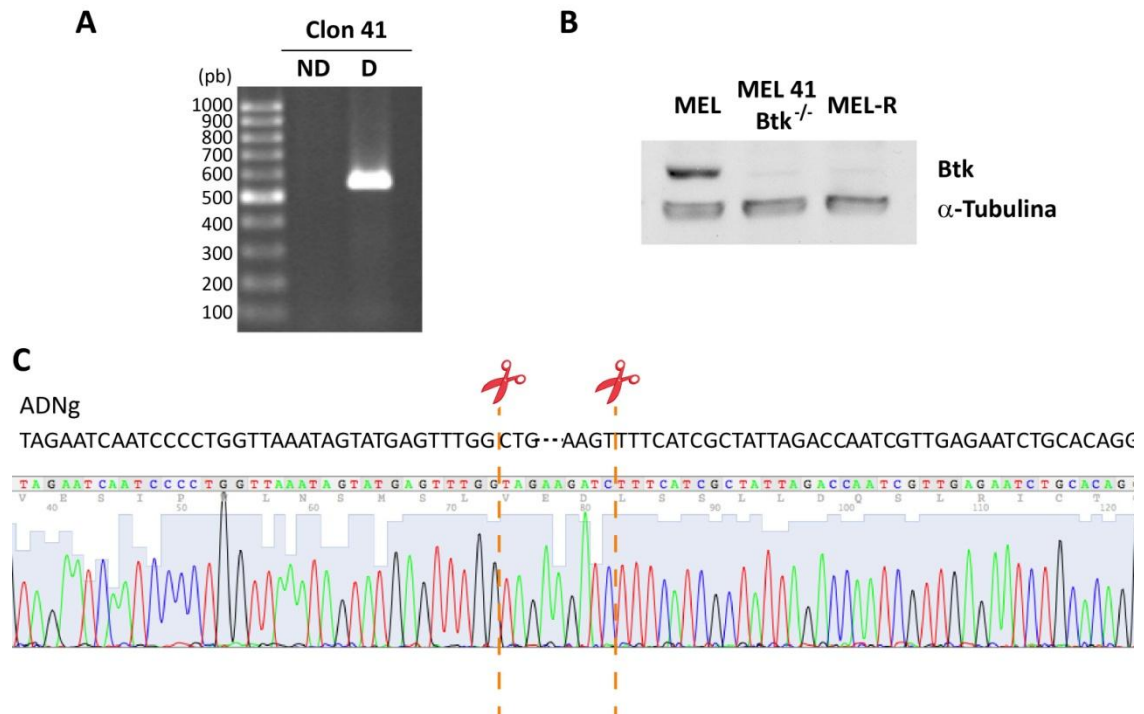


Figura 36. Selección del transfectante 41 de MEL-DS19 con delección bialélica en *Btk*. A) Análisis de la amplificación por PCR de fragmentos del gen de *Btk* llevados a cabo con las parejas de oligonucleótidos de no delección (ND) y de delección (D) en MEL/*Btk*^{-/-} visualizado en un gel de agarosa. B) Cuantificación de la proteína *Btk* mediante *Western blot*. En el estudio se incluyeron extractos proteicos de MEL/*Btk*^{-/-}, MEL-DS19 y MEL-R. El control de carga se realizó mediante la inmunodetección de α -tubulina. C) Secuenciación de la región del genoma delecionada tras la escisión de la nucleasa Cas9. En la parte superior se indica la secuencia genómica original de *Btk*. Los puntos suspensivos negros hacen referencia a la continuación de la secuencia del ADNg que no está representada en el esquema. Las líneas verticales discontinuas de color naranja señalan la región donde la nucleasa Cas9 produce el corte.

Se llevaron a cabo estudios de varios parámetros celulares, incluyendo cinética de crecimiento, tamaño y diferenciación celular, con el fin de determinar diferencias fenotípicas inducidas por la delección de *Btk*. En ningún caso se observaron diferencias significativas a excepción de un pequeño aumento del porcentaje de células indiferenciadas, alcanzando valores de aproximadamente 25%, en contraste al 10% de MEL-DS19 (Figura 37).

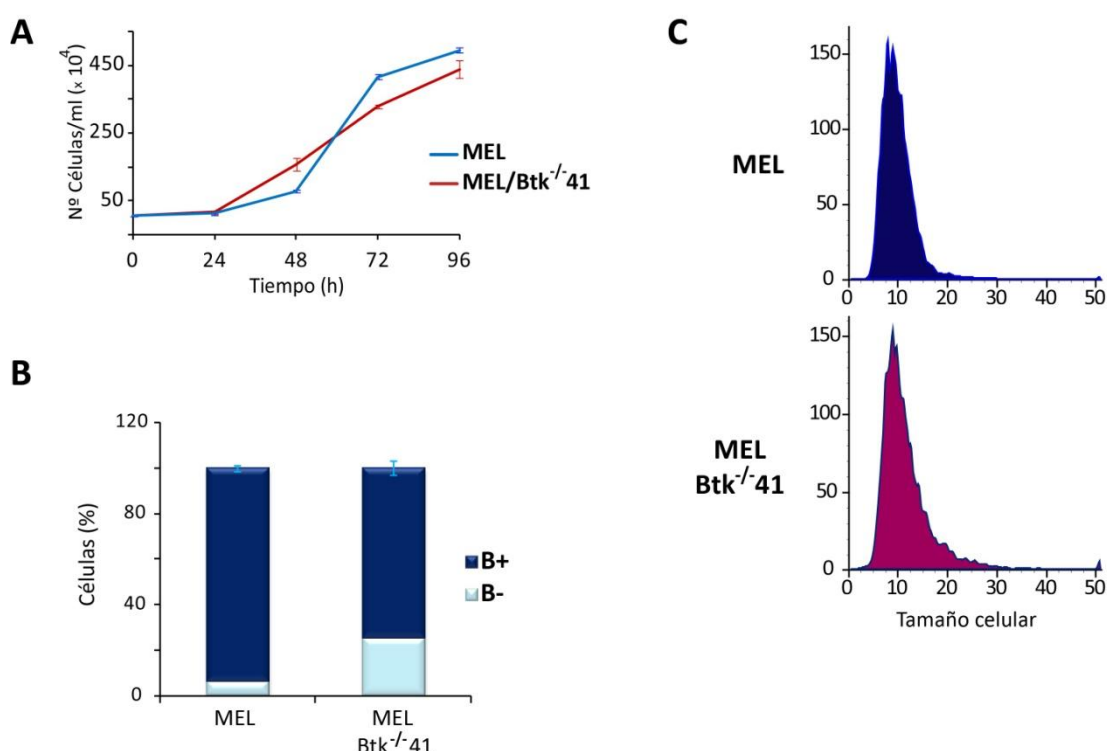


Figura 37. Cinética de crecimiento, diferenciación y tamaño celular en MEL/Btk^{-/-} 41. A) Curva de crecimiento del transfectante MEL/Btk^{-/-} 41. Se realizaron recuentos de los cultivos cada 24h durante 4 días. B) Se analizó la diferenciación celular induciendo la reentrada en el proceso mediante el tratamiento de los cultivos con 5 mM HMBA durante 96 horas. Se determinó el porcentaje de células diferenciadas (B+) a través de un test de benzidina. Las barras en A) y B) muestran las desviaciones estándar de cada triplicado. C) Estudio del tamaño celular mediante citometría de flujo en el clon MEL/Btk^{-/-} 41 y la línea parental (MEL-DS19).

4.3.9. Efecto de la delección de Btk en células MEL-DS19 sobre el citoesqueleto de actina

Con el fin de determinar los posibles efectos de la ausencia de Btk sobre la organización del citoesqueleto de actina se llevó a cabo un análisis de inmunofluorescencia (Figura 38A). Se determinó que la intensidad de la señal de actina en el transfectante delecionado es menor que en la línea parental aunque la distribución es similar, al igual que la cantidad de actina total (Figura 38B).

Para comprobar si la ausencia de Btk en MEL-DS19 afectaba a la polimerización se determinó la cantidad de actina globular (G) y filamentosa (F) en MEL/Btk^{-/-} y en los controles MEL-DS19 y MEL-R. Se observó que la ausencia de Btk provoca una reducción de la forma filamentosa en favor de la G-actina (Figura 38C). Estos resultados se acoplan a los obtenidos con inmunofluorescencia donde se observó un decaimiento de la intensidad de la señal en MEL/Btk^{-/-}. En conjunto,

estos resultados sugieren que la tirosina quinasa de Bruton (Btk), del mismo modo que Was, interviene en el proceso de polimerización y organización del citoesqueleto de actina en la línea celular MEL-DS19.

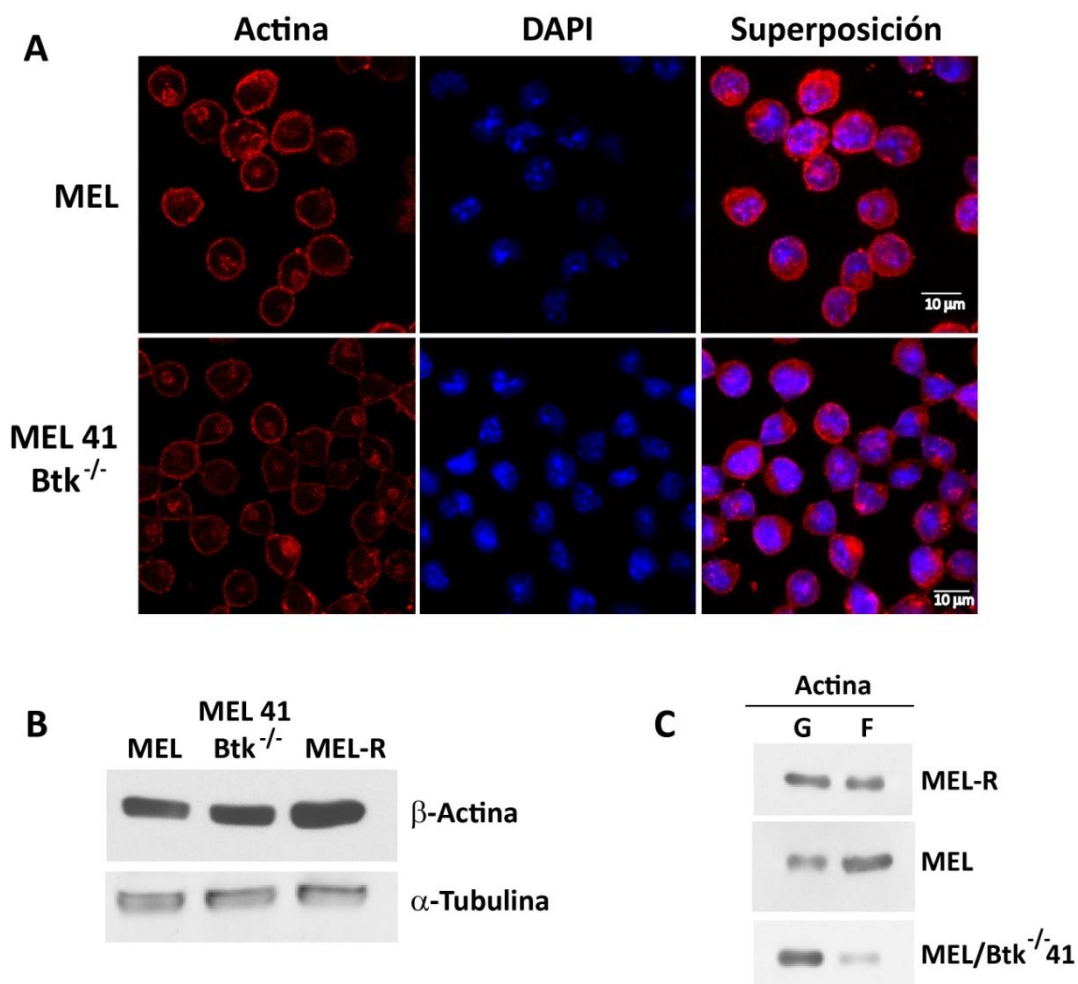


Figura 38. La delección de *Btk* en MEL-DS19 produce cambios en la polimerización de actina. A) La localización y organización de la actina en MEL/Btk^{-/-} se determinó a partir de una inmunofluorescencia. Los núcleos se tiñeron de azul con DAPI y la señal correspondiente a la β -actina se muestra en rojo. Las imágenes fueron captadas empleando un microscopio confocal con un objetivo 100x y zoom. Barra de escala = 10 μ m. B) Cuantificación de la actina total mediante *Western blot* empleando α -tubulina como control de carga. C) Análisis de la forma globular (G) y filamentosa (F) de la actina mediante *Western blot* en MEL-R, MEL-DS19 y MEL/Btk^{-/-}.

4.3.10. Análisis de la expresión de PU.1 y Was en ausencia de Btk

En apartados anteriores (4.3.5. Función de Was como regulador de la transcripción) se observó que Was ejerce una influencia positiva sobre la expresión génica de *Btk*. Se conoce además que Btk puede interaccionar y fosforilar a diversos factores, regulando la transcripción (Petro et al. 2000; Mohamed et al. 2009). El

factor de transcripción PU.1 por su parte, se une corriente arriba del promotor de *Btk* activando así su expresión génica (Himmelman et al. 1996; Christie et al. 2015). Con el objeto de averiguar si Btk está implicado en la modulación de Was y PU.1 se llevó a cabo un análisis de la expresión del transfectante MEL/Btk^{-/-} 41 (Figura 39). Se observó que la expresión de *PU.1* no se modifica aún en ausencia de Btk (Figura 39A). De la misma manera se comprobó que el nivel de Was en MEL/Btk^{-/-} es similar a la línea parental MEL-DS19. En los clones MEL-R/Btk (+) 1, 2 y 3 no se detecta expresión de Was, al igual que en MEL-R (Figura 39B). Estos resultados contrastan con los obtenidos en los transfectantes de Was en donde se demostró que Was actúa corriente arriba de *Btk*, influyendo en su transcripción. En este caso, los resultados indican que Btk no participa en la regulación de *PU.1* o *Was* en células eritroleucémicas.

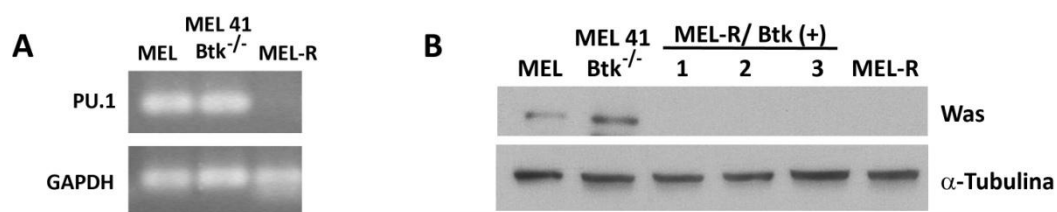


Figura 39. Análisis de la expresión de PU.1 y Was en transfectantes de Btk. A) Se determinó mediante PCR el nivel de transcripción de *PU.1* en el clon 41 de MEL/Btk^{-/-}, MEL-DS19 y MEL-R. La amplificación de GAPDH fue utilizada como control. B) Análisis mediante *Western blot* de la traducción de la proteína Was en MEL/Btk^{-/-} y en los transfectantes de sobreexpresión MEL-R/Btk (+) (1, 2 y 3). El control de carga se llevó a cabo mediante la incubación de la membrana con un anticuerpo Anti-tubulina.

Caracterización de la pleckstrina en células eritroleucémicas

4.3.11. Expresión de Plek en la línea celular MEL-R

La pleckstrina es una proteína descrita exclusivamente en leucocitos y plaquetas. Nuestros resultados han demostrado que *Plek* se expresa asimismo en células del linaje eritropoyético, aunque se encuentra silenciada en la línea resistente MEL-R (Figuras 15 y 16). Con el objeto de determinar si este silenciamiento interfiere en el bloqueo de la diferenciación se transfectaron células MEL-R con el vector pCMV-Plek que contiene la región codificante de pleckstrina (Figura 40A). Se aislaron transfectantes estables mediante diluciones seriadas y se seleccionaron en función de los niveles de proteína mediante *Western blot*. En la

Figura 40B se representan los transfectantes MEL-R/Plek (+) 4 y 5 seleccionados por los altos niveles de pleckstrina.

Como en los casos anteriores respecto a Was y Btk, se analizaron ciertos parámetros, incluyendo cinética de crecimiento y tamaño celular. Se observó que el tiempo de duplicación de los clones MEL-R/Plek (+) 4 y 5 se prolonga moderadamente con respecto a MEL-R (Figura 40C) mientras que el tamaño celular no presenta diferencias significativas (Figura 41).

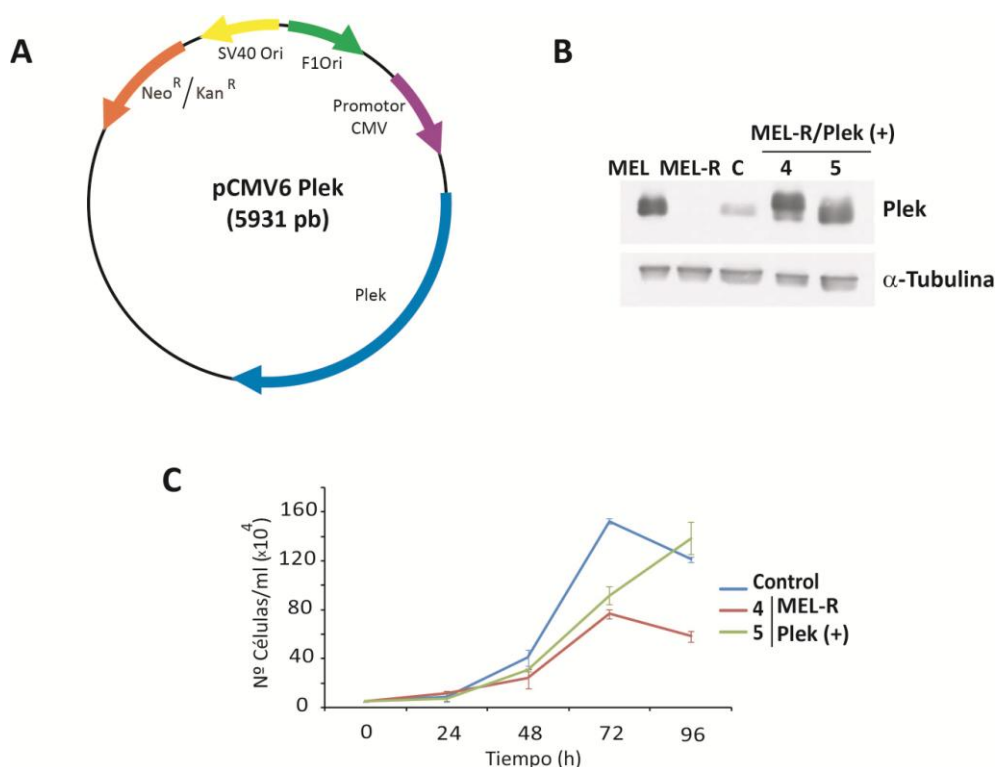


Figura 40. Expresión ectópica de Plek en células resistentes. A) Mapa del vector pCMV6-Plek empleado en la transfección de MEL-R. B) Cuantificación de la pleckstrina en MEL-DS19, MEL-R y los transfectantes MEL-R/Plek (+) 4 y 5. El control C corresponde MEL-R transfectado con el vector vacío. El control de carga se llevó a cabo con la detección de α-tubulina. C) Cinética de crecimiento de los clones seleccionados en B). Las barras representan las desviaciones estándar de cada triplicado.

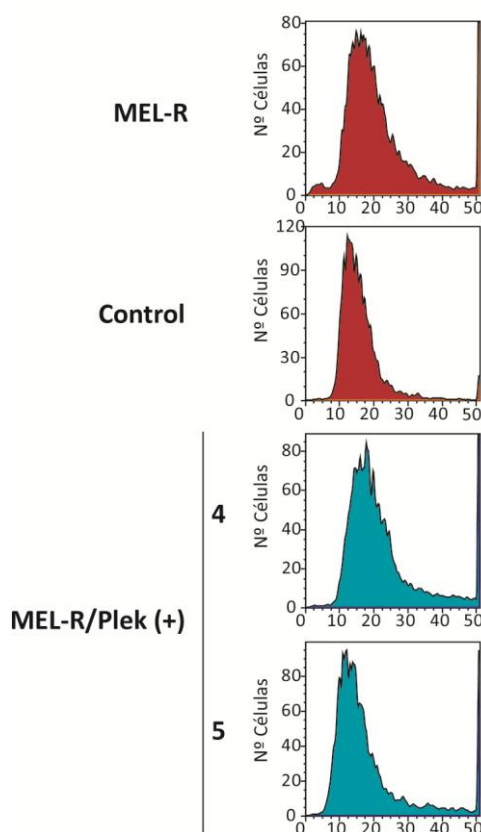


Figura 41. La expresión ectópica de Plek no induce cambios en el tamaño celular de MEL-R. Se determinó el tamaño celular de transfectantes de MEL-R/Plek (+) clones 4 y 5, MEL-R y control (MEL-R transfectado con el vector vacío) mediante citometría de flujo.

4.3.12. La expresión ectópica de Plek no induce una remodelación de la actina en MEL-R

Al igual que en el caso de Was y Btk se ha demostrado que la activación de pleckstrina interviene en la reorganización del citoesqueleto de actina (Ma et al. 1997; Ma and Abrams 1999) motivo por el cual decidimos estudiar su efecto en células eritroleucémicas. La localización de actina en los clones MEL-R/Plek (+) 4 y 5 fue similar en distribución e intensidad en comparación con lo observado en MEL-R (Figura 42A). Los niveles de actina totales por otro lado, son equivalentes en todos los casos (Figura 42B). Estos datos sugieren que la expresión ectópica de pleckstrina en MEL-R no induce una remodelación del citoesqueleto de actina en las células resistentes, a diferencia de lo que ocurría con la sobreexpresión de Was y Btk.

Cuando se analizaron los niveles de G- y F-actina se observó que los transfectantes MEL-R/Plek (+) presentaban un descenso de la actina filamentosa favoreciendo la conformación monomérica respecto a los controles MEL-DS19 y MEL-R (Figura 42C). Estos datos contrastan con los obtenidos en el caso de Was y Btk (Figuras 26 y 34) en donde prevalecen las formas filamentosas.

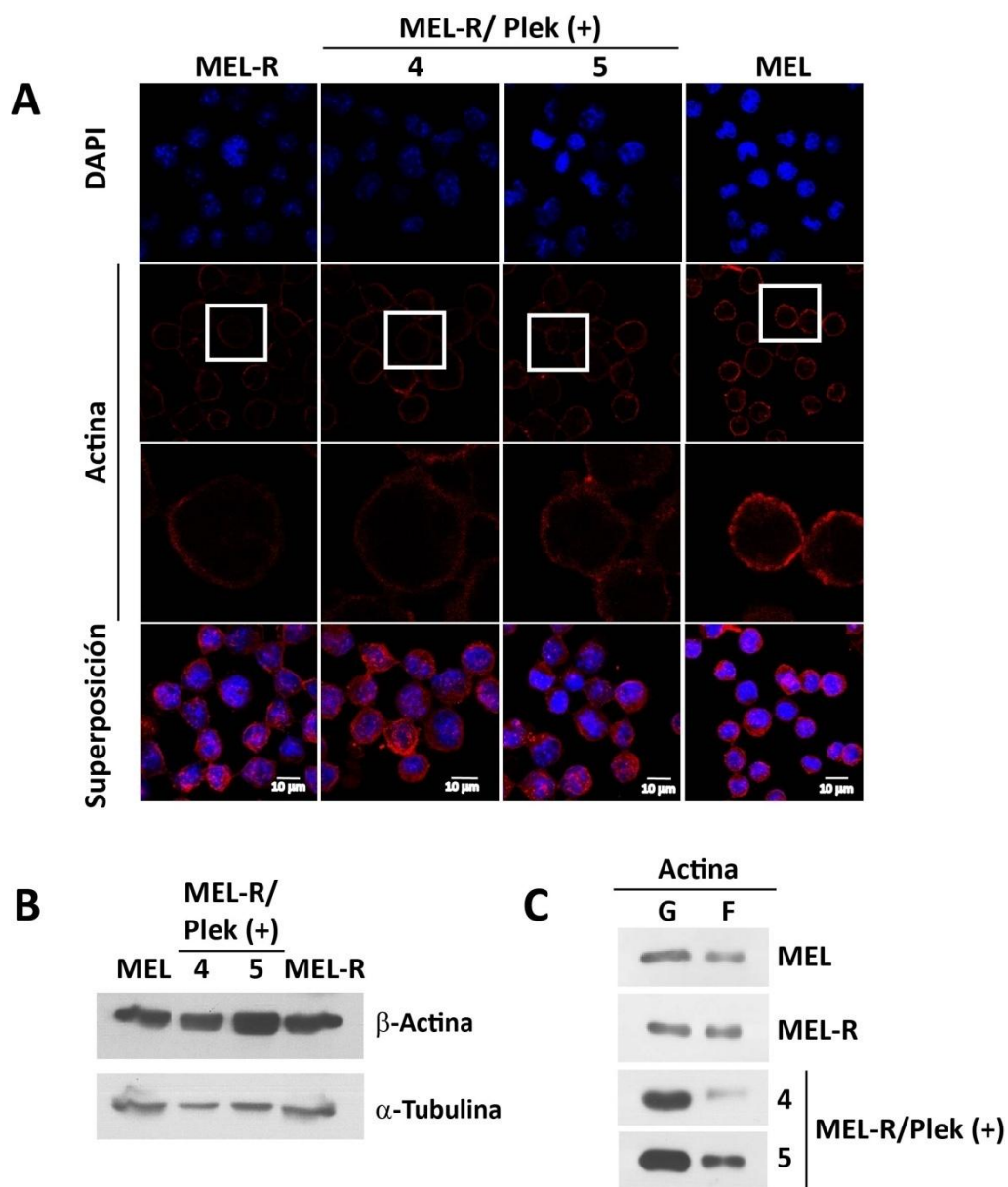


Figura 42. La expresión ectópica de Plek en MEL-R no induce cambios en la organización y polimerización de actina. A) Inmunodetección de la actina en MEL-R, MEL-DS19 y los transfectantes MEL-R/ Plek (+), clones 4 y 5. En rojo se muestra la señal correspondiente a la actina mientras que los núcleos teñidos con DAPI dan lugar a la coloración azul. Las fotografías fueron captadas en un microscopio confocal con el objetivo de inmersión 100x y zoom. Se seleccionó una célula en los paneles de la segunda fila (recuadros blancos) cuya imagen se encuentra ampliada en los paneles de la tercera fila. Barras de escala = 10 μ m. B) Cuantificación de la actina total mediante *Western blot*. Se realizó un control de carga incubando la membrana con anti-tubulina. C) Estudio de la polimerización de actina en MEL-DS19 y MEL-R a partir de la detección de actina monomérica (G-actina) y filamentosa (F-actina) mediante *Western blot* en MEL-DS19, MEL-R y MEL-R/Plek (+).

4.3.13. Delección de *Plek* en células MEL-DS19 basado en el sistema CRISPR/Cas9

Con el fin de analizar la función de pleckstrina y los posibles efectos que provocaría su silenciamiento en MEL-DS19 se deleccionaron 14 Kpb del genoma de ratón correspondiente a los tres primeros exones del gen *Plek* localizado en el cromosoma 11:16871208-16908721 (desde el segmento -40 a +14.045) (Figura 43). Se transfectaron células MEL-DS19 con los vectores pX330-Plek 1 y pX330-Plek 2 conteniendo las secuencias ARNs_g 1 y 2, respectivamente. Se co-transfectó con un tercer vector que expresa la proteína GFP para separar clones por *cell sorting* (ver Materiales y Métodos).

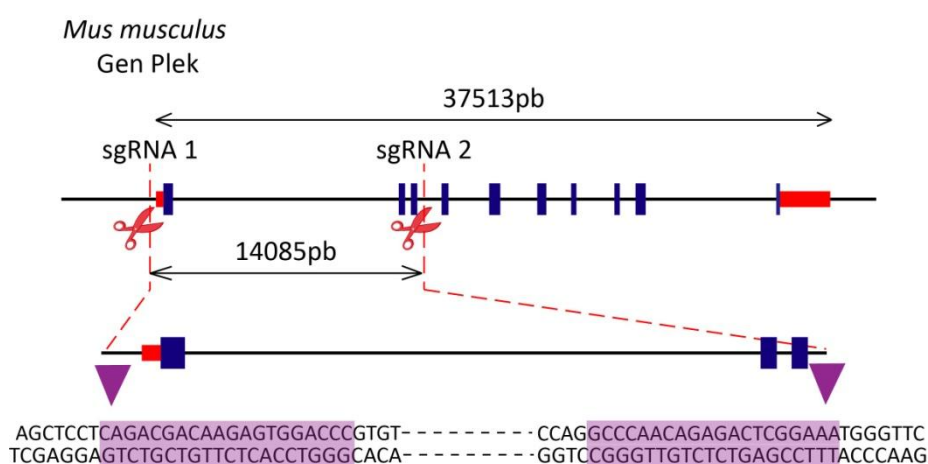


Figura 43. Esquema de la región delecionada del gen *Plek* en MEL-DS19. Mapa genómico de *Plek* donde se delecionó 14 Kpb. Los exones se representan con rectángulos azules y el 5' y 3' UTR con rectángulos rojos. En morado se destacan las secuencias del genoma que reconoce la endonucleasa. Las líneas discontinuas rojas indican las regiones (ARNs_g 1 y ARNs_g 2) donde la endonucleasa Cas9 provoca su escisión.

Se analizaron 280 clones de los cuales se seleccionó el clon 77 cuya delección bialélica se comprobó mediante amplificación por PCR con las parejas de oligonucleótidos de delección (D) y no delección (ND) (Figura 44A). Se corroboró la delección bialélica cuantificando la proteína mediante *Western blot* confirmando la ausencia de pleckstrina en MEL/*Plek*^{-/-} 77 (Figura 44B).

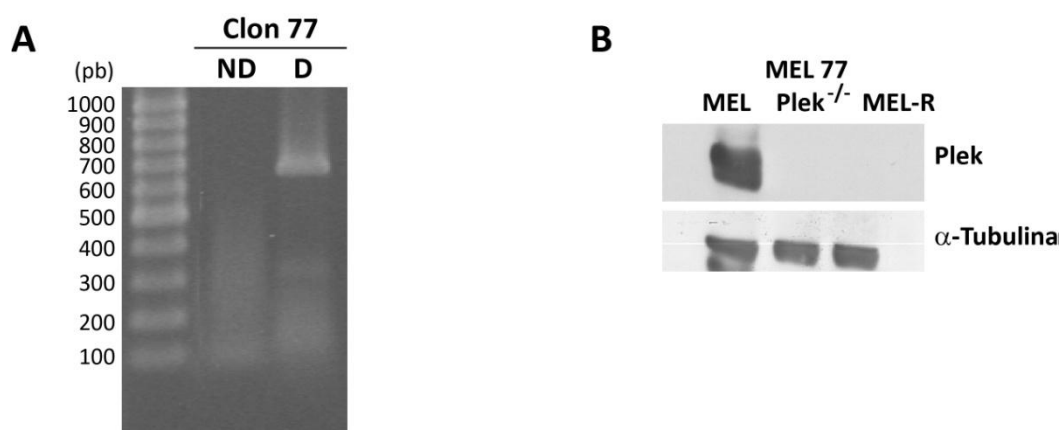


Figura 44. Selección del clon 77 con la delección de *Plek* en células MEL-DS19. A) Análisis del producto de PCR realizado con las parejas de oligonucleótidos de no delección (ND) y de delección (D) en el transfectante 77 de MEL-DS19. B) Estudio de la traducción de *Plek* a partir de extractos proteicos de los clones MEL/*Plek*^{-/-} 77. Se incluyeron muestras de MEL-DS19 y MEL-R como control positivo y negativo, respectivamente. La α -tubulina se empleó como control de carga.

Con el fin de caracterizar fenotípicamente el clon MEL/*Plek*^{-/-} se realizó un estudio de la duración del ciclo, del tamaño y de la diferenciación celular. Se comprobó que el transfectante MEL/*Plek*^{-/-} presentaba un ligero retraso en la cinética de crecimiento respecto a la línea parental hasta llegar a la saturación del cultivo a las 96 horas (Figura 45A). El estudio de la diferenciación celular (Figura 45B) así como el tamaño celular (Figura 45C) no mostró diferencias en ningún caso.

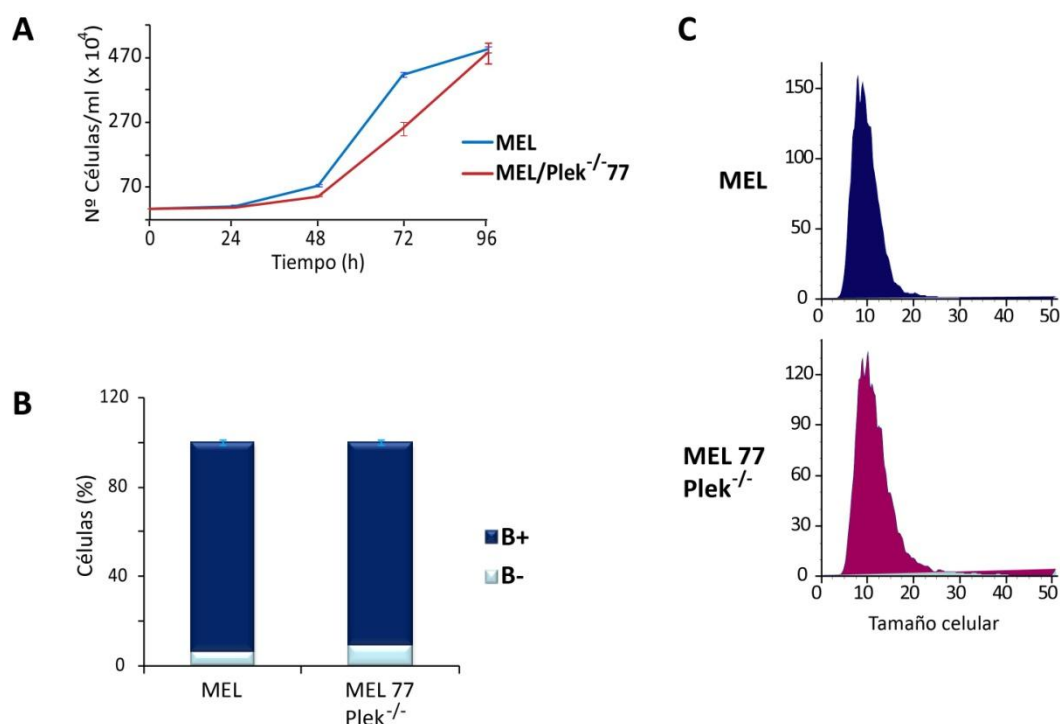


Figura 45. Cinética de crecimiento, diferenciación y tamaño celular en MEL/Plek^{-/-}. A) Curva de crecimiento celular de MEL/Plek^{-/-}. Se contabilizaron muestras por triplicado cada 24 horas durante 4 días. B) Efecto de la delección de *Plek* sobre la diferenciación celular en células tratadas con 5mM HMBA durante 4 días. Se contabilizó el porcentaje de células benzidina positivas (B+), representadas en azul oscuro. Las barras en A) y B) muestran las desviaciones estándar de cada muestra por triplicado. C) Determinación del tamaño celular MEL/Plek^{-/-} 77 y MEL-DS19 mediante citometría de flujo.

4.3.14. La ausencia de Plek en MEL-DS19 induce cambios en la polimerización de actina

Con el objeto de determinar si la ausencia de Plek interfiere con la organización de actina se analizaron por inmunofluorescencia muestras de MEL/Plek^{-/-}, MEL-DS19 y MEL-R (Figura 46A). Se observó que la intensidad de la señal de actina en el transfectante es superior al de la línea parental. La cantidad de actina total por su parte es similar en todas las muestras (Figura 46B). Se determinó además la presencia de las formas globular (G) y filamentosa (F) de la actina observándose un aumento de la forma filamentosa en el transfectante, datos que corroboran lo observado en las inmunofluorescencias (Figura 46C).

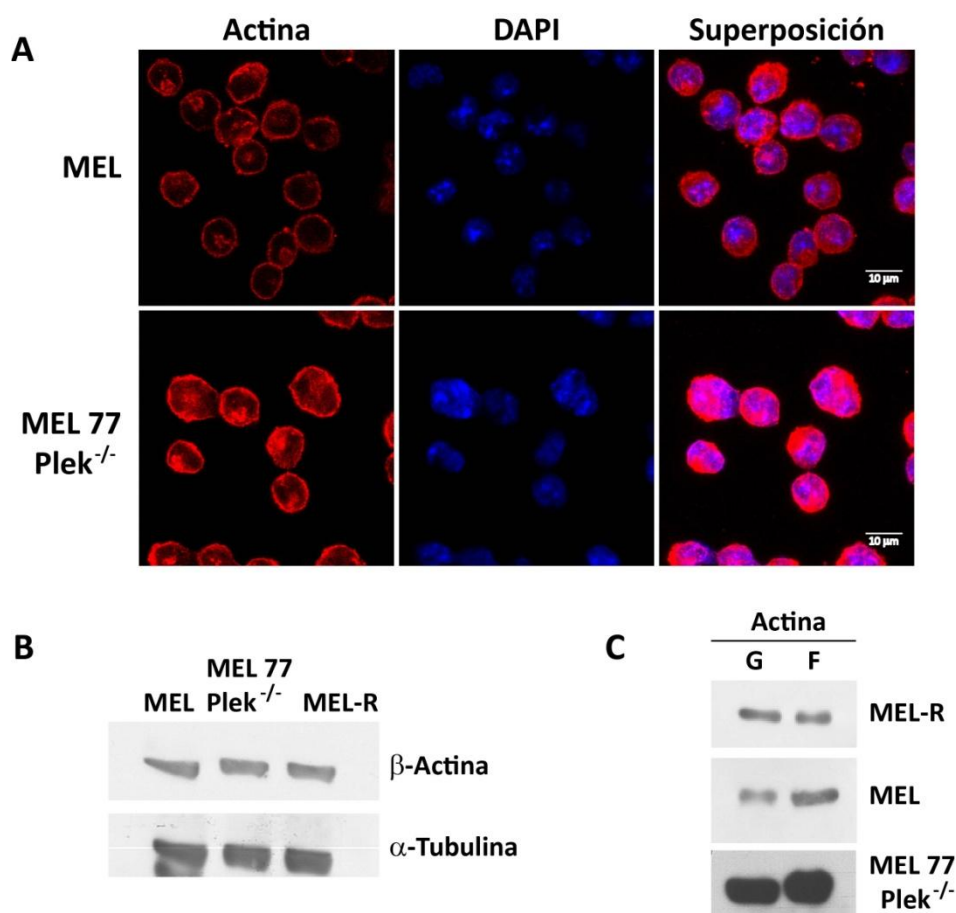


Figura 46. Análisis del citoesqueleto de actina en MEL/*Plek*^{-/-}. A) Inmunodetección de la β -actina en MEL/*Plek*^{-/-} y en la línea parental (MEL-DS19). En rojo se observa la señal correspondiente a la actina y en azul los núcleos teñidos con DAPI. Las imágenes fueron captadas en un microscopio confocal con un objetivo de inmersión 100x y zoom. Barra de escala = 10 μ m. B) Cuantificación de la proteína actina mediante *Western blot* en MEL/*Plek*^{-/-}, MEL-DS19 y MEL-R. El control de carga se realizó mediante la inmunodetección de α -tubulina. C) Estudio de la polimerización de actina a partir de la detección de actina monomérica (G-actina) y filamentosa (F-actina) en un *Western blot*.

4.3.15. Función de la pleckstrina como regulador transcripcional

Con el objeto de determinar si la pleckstrina podría participar en la regulación de la transcripción de otros genes cuyas funciones están relacionadas con el citoesqueleto de actina o con el proceso de diferenciación celular se llevó a cabo un análisis de la expresión de *Was*, *PU.1* y *Btk* en MEL/*Plek*^{-/-} (Figura 47). Se observó que la ausencia de pleckstrina no modifica los niveles de expresión respecto a la línea parental (Figura 47A).

Paralelamente, se cuantificó la cantidad de Was de los clones MEL-R/Plek (+) 4 y 5 y el clon MEL/Plek^{-/-} 77. Se comprobó que el nivel de proteína en MEL/Plek^{-/-} es similar a la línea parental MEL-DS19. Mientras que en los clones MEL-R/Plek (+) 4 y 5 no se expresa Was, al igual que en MEL-R. De la misma manera se analizaron los niveles proteicos de Btk. Los resultados obtenidos mostraron que los transfectantes que expresan ectópicamente Plek, MEL-R/Plek (+), presentan un patrón de traducción similar a MEL-R, siendo el clon 5 el más eficiente. Asimismo el transfectante MEL/Plek^{-/-} presenta niveles de Btk inferiores a MEL-DS19 (Figura 47B). Estos datos indicaron que la pleckstrina ejerce un papel en la modulación de la expresión génica de *Btk*, pero no de *Was*.

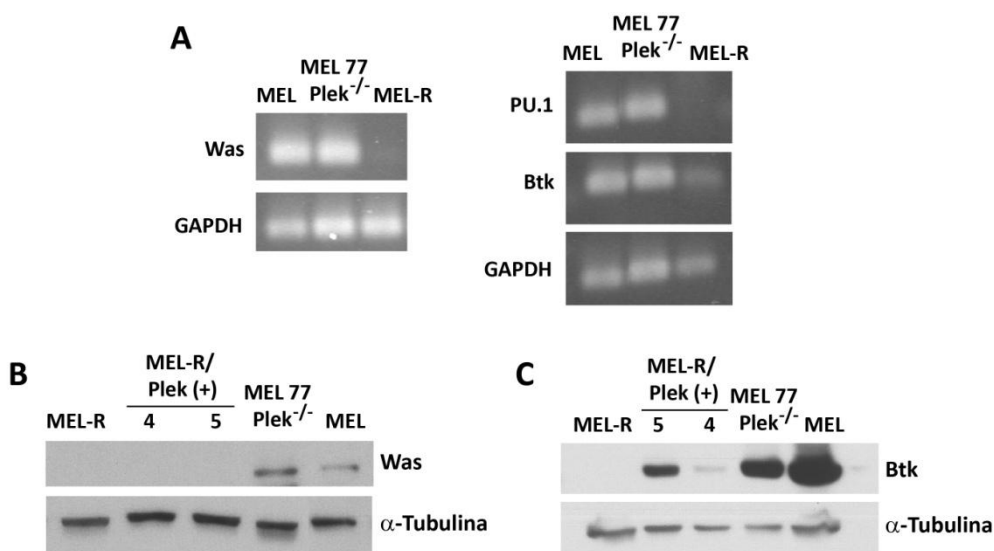


Figura 47. Análisis de la expresión de Was, PU.1 y Btk en los transfectantes de Plek. A) Análisis de la expresión génica de *PU.1*, *Btk* y *Was* mediante PCR en MEL-DS19, MEL-R y MEL/Plek^{-/-}. GAPDH se empleó como control. B) Cuantificación de Was mediante *Western blot* en clones de sobreexpresión MEL-R/Plek (+) y de delección MEL/Plek^{-/-}. C) Inmunodetección de la proteína Btk en los clones MEL-R/Plek (+) y MEL/Plek^{-/-}. En el análisis se incluyeron las líneas parentales correspondientes, MEL-DS19 y MEL-R. En B) y C) el control de carga se llevó a cabo incubando la membrana con un anticuerpo anti-αtubulina.

5. Discusión

5.1. MEL-R como modelo para estudios de resistencia a inductores de diferenciación

Las células tumorales tienen la capacidad de adquirir con frecuencia mecanismos de resistencia a distintas quimioterapias. Esto se debe en parte, a mutaciones y/o cambios epigenéticos a nivel del genoma, lo cual representa un grave obstáculo para los tratamientos contra el cáncer (Rebucci and Michiels 2013). El estudio de los mecanismos moleculares y celulares causantes de esta resistencia es por lo tanto, uno de los intereses esenciales en la investigación clínica y básica. Dentro de este campo, los modelos que utilizan células tumorales en cultivo han demostrado ser altamente eficaces aportando avances importantes en el conocimiento de este proceso (Mitra et al. 2013).

En la presente tesis doctoral se utilizó una línea celular resistente a la diferenciación, derivada de células Friend eritroleucémicas, establecida previamente en nuestro laboratorio (Fernandez-Nestosa et al. 2008). Ambas líneas celulares (MEL-DS19 y MEL-R) permanecen bloqueadas en la progresión hacia el linaje eritroide que, en condiciones normales, debería culminar en la formación de eritrocitos. Las células MEL-DS19 son capaces de retomar el programa de diferenciación estimuladas por diversos agentes químicos. Las células resistentes MEL-R, por el contrario, han perdido la capacidad de reaccionar a estos compuestos y proliferan indefinidamente en presencia de HMBA o DMSO, entre otros. Es así que mientras que las células MEL-DS19 constituyen un sistema idóneo para estudiar diferentes aspectos de la diferenciación celular y del bloqueo del proceso, las líneas MEL-R componen un modelo adecuado para investigar las causas que provocan la resistencia hacia distintos agentes químicos.

El fenotipo de las células resistentes MEL-R difiere en algunos aspectos de la línea progenitora. Las células resistentes presentan una distribución de las fases del ciclo celular similar a lo observado en cultivos de MEL-DS19 sin diferenciar (Kiyokawa et al. 1993; Vanegas et al. 2003). Sin embargo, las MEL-R generan células tetraploides, independientemente de la presencia de HMBA en el medio de cultivo, debido probablemente a la duplicación del ADN sin una posterior división celular. Fujiwara y colaboradores, bloqueando transitoriamente la citoquinesis en células

epiteliales de ratón deficientes en p53, demostraron que la tetraploidía aumenta la frecuencia de alteraciones cromosómicas y promueve el inicio de un tumor (Fujiwara et al. 2005). De igual manera, en líneas celulares de linfomas humanos Illidge y colaboradores determinaron que estas células entran en varias rondas de endoreduplicación generando poliploidía (Illidge et al. 2000). En ambos casos, se especula con que este fenotipo favorece el desarrollo de un mecanismo de escape al daño genotóxico facilitando cambios en el metabolismo celular (Weaver and Cleveland 2006; Chen et al. 2012; Coward and Harding 2014). El incremento de la ploidía podría de esta forma acelerar la resistencia de las células tumorales a los tratamientos habituales de quimioterapia o radioterapia (Coward and Harding 2014).

El aumento de tamaño celular en MEL-R unido a la tetraploidía observada podría estar en línea con el anterior argumento justificando el establecimiento de la resistencia frente, en este caso, al HMBA o DMSO.

5.2. La resistencia de las células eritroleucémicas va acompañada de un silenciamiento génico

La reprogramación de células eritroleucémicas tumorales hacia la diferenciación eritropoyética, que mimetiza la diferenciación terminal eritroide, lleva involucrada una serie de cambios entre los que destacan la supresión de programas de expresión, la activación de genes linaje-específicos y la remodelación de la cromatina (Gan et al. 2010; Yu et al. 2013). Según los datos del ARN-seq analizados en este trabajo, un gran número de genes (596) transcriben diferencialmente en ambas líneas celulares, si bien con un sesgo en favor de las células parentales de un 81%. La actividad transcripcional de la línea MEL DS19 por lo tanto, supera significativamente a la observada en la línea resistente, o lo que es lo mismo, hay un silenciamiento génico drástico que culmina en el fenotipo de MEL-R. Un fenómeno similar se observa durante la diferenciación terminal espontánea o inducida por HMBA (Marks et al. 1994; Vanegas et al. 2003).

Este silenciamiento génico se produce en paralelo a un proceso progresivo de heterocromatinización, según se evidencia en base a los resultados del aumento

de la HP1 α en MEL-R y en MEL-DS19 diferenciadas. La condensación gradual de la cromatina en la fase final de la diferenciación eritropoyética induce un silenciamiento génico que es esencial para un correcto acceso al programa de diferenciación celular y en especial para el proceso de enucleación (Wong et al. 2011). Los datos aportados en este trabajo, especialmente en relación con la heterocromatinización, sugieren que las células MEL-R conforman un estadio intermedio entre las células indiferenciadas y las que están en proceso de diferenciación. Si el silenciamiento génico ocurre de forma concomitante a la condensación de la cromatina, sería interesante comparar en el futuro la actividad transcripcional de las MEL-R con las MEL-DS19 en estado diferenciado.

Los cambios de metilación del ADN son también fundamentales en el programa de diferenciación eritropoyética observándose una demetilación global dependiente de la replicación del ADN, proceso que se encuentra acompañado de una disminución de las enzimas metilasas *de novo*, Dnmt3a y Dnmt3b (Shearstone et al. 2011). Nuestros resultados demuestran que parte del silenciamiento génico observado en MEL-R se debe a la metilación de las islas CpGs de los promotores de los genes *Was*, *Btk* y *Plek*, situación similar a la observada previamente en el factor de transcripción PU.1 (Fernandez-Nestosa et al. 2013). La inducción de la diferenciación con HMBA no modifica el estatus de metilación de *Was*, *Btk* y *Plek* en las células MEL-DS19, observándose siempre una hipometilación de estos genes asociado a un estado transcripcionalmente activo. Estos resultados ayudan a engrosar los datos que sostienen la importancia de la red de factores que sustentan el citoesqueleto de actina en los procesos de diferenciación, en este caso, con una especial mención al linaje eritropoyético. El incremento de la ADN metilasa Dnmt1 y la disminución de la demetilasa Tet3 en las líneas resistentes armonizan perfectamente con los resultados anteriores.

Es interesante señalar por otra parte, que durante la diferenciación de osteoclastos se observó la interacción entre el factor de transcripción PU.1 y la demetilasa Tet2, escenario que favorecía la demetilación del ADN. PU.1 también se une a la metiltransferasa Dnmt3b induciendo la metilación (de la Rica et al. 2013). De estos datos se deduce que PU.1, al menos durante la osteoclastogénesis, puede

actuar como un adaptador dual de la hipo- e hipermetilación. Una hipótesis plausible derivada de nuestros resultados es la posible relación entre la ausencia de PU.1 en MEL-R y los niveles de metilación observados. Durante la eritropoyesis, de manera análoga a la situación descrita en la osteoclastogénesis, PU.1 podría ejercer un papel dual mediante su unión a la metilasa Dnmt1 y demetilasa Tet3. La carencia de la proteína PU.1 en la línea celular MEL-R favorecería una desregulación génica a través de la activación/represión epigenética inducida por Dnmt1 y Tet3. Esta hipótesis sin embargo, no sería aplicable de forma universal, tal como se deduce de los resultados respecto a los genes que codifican histonas. Los datos indican que en todos los casos, MEL-R y MEL-DS19 sin tratar o diferenciadas, las islas CpG de los respectivos promotores de las histonas están demetiladas lo cual sugiere que la regulación génica en estos casos está mediada por otros mecanismos, independientes de la metilación.

5.3. Histonas en MEL-R ¿sobreexpresión o redundancia?

La línea celular MEL-R representa una incógnita desde el punto de vista del proceso de diferenciación. Por un lado, las células manifiestan un fenotipo similar al de las líneas parentales no diferenciadas: expresan altos niveles de genes implicados en proliferación y ciclo celular como *c-myc*, *c-myb*, p21; permanecen silenciados genes que antagonizan con los primeros y bloquean diferenciación como *mad1* o p27; expresan factores de transcripción específicos del linaje eritroide, GATA1 y EKLF, pero está silenciado PU.1, factor antagonista de GATA1 y responsable del fenotipo tumoral en MEL-DS19 (Fernandez-Nestosa et al. 2008). Otra de las diferencias notables, puesto de manifiesto a través del ARN-seq, es que de los 110 genes que presentan una mayor expresión en las células resistentes respecto a las progenitoras, destacan el grupo de las histonas, tanto de replicación como variantes, representando un 16% del total de estos 110 genes. Cabe preguntarse si acaso el aumento de la transcripción de histonas es un factor necesario para la remodelación y el correcto empaquetamiento de la cromatina, dado incluso el aumento de la ploidía de las células resistentes.

Las histonas son esenciales para la viabilidad celular y un exceso de las mismas puede desencadenar procesos de inestabilidad genómica, aumento de la sensibilidad a agentes que dañan el ADN y de la citotoxicidad (Singh et al. 2010). Un estudio reciente llevado a cabo en ratones ha demostrado que en la fase terminal de diferenciación eritropoyética se forman aperturas en el núcleo celular que permiten la salida parcial de histonas hacia el citoplasma donde son degradadas por el proteosoma. La pérdida parcial del *core* de histonas y del *linker* hacia el citoplasma tiene lugar de forma selectiva y podría ser un mecanismo eficiente de eliminación de histonas cuando ya no son necesarias en el núcleo (Zhao et al. 2016).

Los resultados obtenidos en células MEL-DS19 diferenciadas con HMBA, que representan un estado análogo a los reticulocitos, revelan que hay un aumento de los transcritos de histonas respecto a la línea parental. Este proceso ocurre de forma similar en las células resistentes. Durante la transición de las CFU-E a eritrocitos maduros en la eritropoyesis de pollo se produce un aumento gradual de la histona H5 de hasta cuatro veces, desplazando a las histonas H1 (Affolter et al. 1987). Este mecanismo representa una situación comparable a la observada en las líneas celulares MEL-R y MEL-DS19 diferenciadas, donde aumenta la transcripción de histonas de replicación pertenecientes a todas las familias a excepción de la H4.

En el presente estudio además, destacan las histonas variantes H1f0, H2afx y H3f3b por su alto nivel de expresión en MEL-R y MEL-DS19 diferenciadas. Tanto a la histona H1f0 como a la H2afx se les atribuye una función represora asociada a la condensación de la cromatina (Doenecke et al. 1994; Kamakaka and Biggins 2005; Izzo et al. 2008; Bonisch and Hake 2012). El caso de la H3f3b es controvertido. Se ha descrito su asociación a zonas de cromatina activa marcando zonas eucromáticas (Goldberg et al. 2010; Talbert and Henikoff 2010; Lin et al. 2013), pero también se ha demostrado que la H3f3b se localiza en promotores de genes silenciados y en regiones heterocromáticas (Goldberg et al. 2010; Lin et al. 2013).

En conjunto estos datos, unido al hecho de que hay un proceso de heterocromatinización en MEL-R y en las células diferenciadas, sugieren que las células resistentes se encuentran en un punto intermedio entre las diferenciadas y

la línea parental, aunque por causas desconocidas se produce un bloqueo que interfiere con la diferenciación terminal en las células MEL-R.

5.4. Citoesqueleto de actina, más que un soporte celular

En el presente trabajo se han identificado genes con mayor expresión diferencial en MEL-DS19 respecto a MEL-R con dos características comunes importantes: son genes implicados en el desarrollo y organización del citoesqueleto de actina y se activan específicamente en el linaje hematopoyético. Las mutaciones producidas en algunos de estos genes como *Was*, *Btk* o *Dock2*, provocan el desarrollo de enfermedades hematológicas severas (Catucci et al. 2012; Hendriks et al. 2014; Dobbs et al. 2015). La pérdida de función de *Was* desencadena el desarrollo del síndrome de Wiskott-Aldrich, asociado a defectos en una gran cantidad de procesos celulares que producen inmunodeficiencias, trombocitopenia y alteraciones autoinmunes (Thrasher 2002). La activación constitutiva de *Was*, por otro lado, altera la polimerización de actina provocando defectos en el proceso mitótico (Thrasher and Burns 2010). Asimismo, la inhibición de *Btk* afecta a las vías de señalización TLR2 y TLR4 de células mieloides (Horwood et al. 2006), a la función de la interleuquina 10 y STAT3 de células dendríticas (Kawakami et al. 2006), al desarrollo de neutrófilos (Fiedler et al. 2011) y a la agregación de las plaquetas (Quek et al. 1998).

En los últimos años han surgido evidencias que relacionan el citoesqueleto de actina con la regulación de las vías de señalización (Mattila et al. 2016). Como se comentó anteriormente, uno de los problemas en el tratamiento contra el cáncer es la aparición de multi-resistencia a fármacos (MDR) que en varios casos se ha asociado con cambios en el citoesqueleto de actina (Desouza et al. 2012). Nuestros resultados muestran una deficiencia en la organización de actina en las células resistentes que induce a pensar en una posible implicación del citoesqueleto en el bloqueo de la diferenciación celular. Takeshita y colaboradores observaron en células de osteosarcoma con MDR la presencia de haces de filamentos de actina asociados a la organización del citoesqueleto lo cual sugería cierta implicación con el proceso de diferenciación (Takeshita et al. 1998). Las células del carcinoma

humano constituyen otro ejemplo donde se produce la remodelación del citoesqueleto durante la adquisición de resistencia a la diferenciación. En estos casos, las células resistentes acumulan proteína YAP/TAZ acompañada de un aumento de la formación de filamentos (Kim et al. 2016). Estos estudios apoyan las observaciones realizadas en MEL-R sugiriendo que los cambios en la organización del citoesqueleto de la actina son esenciales en la adquisición de la resistencia a la diferenciación.

La enucleación es un proceso peculiar e inherente a los eritroblastos de mamíferos. El citoesqueleto desempeña un papel fundamental en el mismo, que requiere la actuación coordinada de diversas rutas de señalización capaces de integrar el tráfico vesicular, microARNs específicos, interacciones célula-matriz o la polimerización de actina (Ji et al. 2011). Un ejemplo de la complejidad de la red de proteínas que conforman el citoesqueleto de actina es la activación de Was a través de cdc42 y PIP2, por proteínas con dominios SH3, como Btk, Nck, Vasp, o por la fosforilación en la tirosina 291 (Blundell et al. 2009; Dovas and Cox 2010). Otro caso es la activación de Rac2 a través de Dock2 que desencadena la reorganización del citoesqueleto induciendo la formación de lamelipodios que fuerzan el movimiento y como consecuencia la migración de linfocitos (Fukui et al. 2001; Sanui et al. 2003). La Figura 48 intenta resumir las interacciones que se han descrito entre algunas de las proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina. El silenciamiento de algunos de estos genes, tal como se demuestra en este trabajo, promueven en las células resistentes deficiencias en la organización de la actina.

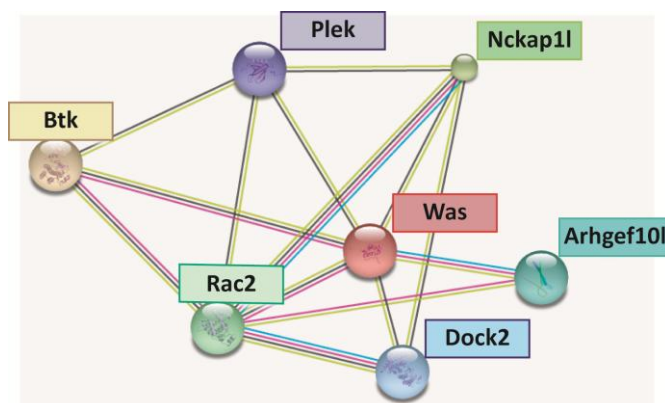


Figura 48. Esquema de las interacciones de proteínas cuyas funciones están relacionadas con el citoesqueleto de actina. Las esferas de mayor tamaño representan a las proteínas cuya estructura 3D es conocida o ha sido predicha; aquellas de las que no se tienen datos se muestran más pequeñas. Las interacciones entre proteínas conocidas se representan en azul (registrados en base de datos) o en rosa (demostrados experimentalmente). Las proteínas que se co-expresan están unidas por una línea negra; aquellas que aparecen en algún texto están conectadas por un segmento amarillo.

5.5. Was y Btk como reguladores positivos del citoesqueleto de actina

La delección de *Was* en células MEL-DS19 induce la desorganización del citoesqueleto de actina y una drástica reducción de la actina filamentosa en favor de la forma globular libre (Figura 30). Este fenotipo es capaz de revertir cuando se induce de nuevo la expresión de *Was*. Como se ha descrito en numerosos trabajos, *Was* es el principal activador del complejo Arp2/3 en células hematopoyéticas, cuya función es la formación de nuevos filamentos de actina (Ochs and Thrasher 2006; Blundell et al. 2010). La disminución de los filamentos de actina en las células MEL-DS19 en ausencia de *Was* sugieren que la principal vía de polimerización de actina está mediada por el complejo Arp2/3 activado por *Was*.

La tensión y rigidez, y en definitiva la organización, del citoesqueleto afectan a la sensibilidad de las células tumorales a los tratamientos quimioterapéuticos (Nguyen et al. 2014; Sharma et al. 2014). Las células resistentes, al igual que las MEL-DS19, presentan cantidades similares de actina monomérica libre respecto a la forma filamentosa. Sin embargo, las MEL-R no expresan *Was* lo que nos lleva a plantear dos hipótesis plausibles y no excluyentes para explicar posibles mecanismos de la polimerización de actina en ausencia de *Was*: pudiendo desarrollar otras vías y/o empleando factores de nucleación de actina alternativos

capaces de unirse al complejo Arp2/3. La familia WASP-WAVE es un modulador importante del complejo Arp2/3 (Tyler et al. 2016). En los últimos años se han descrito componentes adicionales de la que incluyen a WASH (Linardopoulou et al. 2007), WHAMM (Campellone et al. 2008) y JMY (Zuchero et al. 2009).

Las profilinas constituyen una vía de polimerización de actina independiente al complejo Arp2/3. Los datos obtenidos en el ARN-seq mostraron la profilina 2 aumenta su expresión en las células resistentes respecto a la línea parental (FPKM de 29,56 y 9,8 en MEL-R y MEL-DS19, respectivamente). Las profilinas son proteínas de unión a la actina que promueven la polimerización. Se ha visto que la inhibición de la expresión de la profilina 2 en cerebros de ratón provoca el bloqueo de la formación de filamentos de actina (Pilo Boyl et al. 2007). Además, la desregulación de la profilina 2 se asocia con diversas enfermedades como la glomeruloesclerosis focal segmentaria (FSGS) donde se ha demostrado que existe un aumento de la interacción de la formina INF2 con la profilina 2 y la proteína que sella el extremo de la F-actina, CapZ α -1 (Rollason et al. 2016). Otro ejemplo lo constituyen las células tumorales de pulmón donde la sobreexpresión de la profilina 2 provoca la interacción con la histona deacetilasa 1 (HDAC1) impidiendo su locación en el núcleo cuya función es activar epigenéticamente la transcripción de Smad2 y Smad3 (Tang et al. 2015). En resumen, la correcta regulación de la profilina 2 es esencial para una polimerización de la actina adecuada. En línea con estos estudios, dicha proteína podría desempeñar un papel importante en la formación de filamentos de actina en las células MEL-R cuyo estudio con mayor detalle sería interesante abordar en futuros análisis.

Por otro lado, se ha visto que Btk conecta las señales de los receptores de linfocitos B con la remodelación de la actina mediante el control de la actividad de Was a través de diferentes mecanismos (Sharma et al. 2009; Liu et al. 2013a). Btk se une a la región rica en prolinas de Was provocando la activación de la GTPasa cdc42 mediante Vav que actúa como un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) y aumentando la síntesis de PIP2 que es un co-activador. La otra vía de actuación corresponde a su actividad tirosina quinasa, fosforilando el residuo de tirosina 291 de Was (Liu et al. 2013a; Hendriks et al. 2014). El análisis realizado en la

presente tesis determina que la expresión ectópica de Btk en células MEL-R induce la polimerización de actina aún en ausencia de Was, sugiriendo que Btk no sólo regula la activación de Was y como consecuencia la polimerización del citoesqueleto de actina, sino que también es capaz de actuar mediante la unión directa a los filamentos preexistentes o a través de otras proteínas con las que podría interactuar. Un estudio previo realizado por Qiu y Kung indica que Btk interacciona a través de su dominio PH con filamentos de actina promoviendo la formación de haces *in vitro* (Qiu and Kung 2000). Este dato apoyaría las observaciones realizadas en MEL-R cuando se expresa Btk.

5.6. Plek como regulador negativo del citoesqueleto de actina

Haslam y colaboradores describen la pleckstrina en el año 1979 como una proteína específica de leucocitos y plaquetas, pero ausente en eritrocitos (Haslam et al. 1979). Posteriormente, se confirma la presencia de pleckstrina en las células leucémicas HEL (Gailani et al. 1990). Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral demuestran que la pleckstrina es un gen muy activo no sólo en las células eritroleucémicas MEL-DS19 sino también en las células diferenciadas, corroborando la expresión de la proteína en el linaje eritropoyético.

El dominio característico de la pleckstrina, PH (*Pleckstrin Homology domain*), está presente en numerosas proteínas del citoesqueleto, incluyendo Btk y la propia Plek (Lemmon et al. 2002). Se ha observado que la forma fosforilada de la proteína, y por tanto activa, provoca la disolución de filamentos de actina en líneas celulares transformadas y primarias (Ma and Abrams 1999). Se ha demostrado además, que tanto la pleckstrina como su paróloga pleckstrina2, intervienen en la formación de lamelipodios, vellosidades y ondulaciones en las membranas celulares a partir de la reorganización del citoesqueleto de actina (Ma et al. 1997; Hu et al. 1999; Zhao et al. 2014). El aumento de filamentos de actina en células MEL-DS19 en ausencia de pleckstrina fue en este sentido un resultado paradójico indicando una posible regulación negativa. Una de las posibilidades derivadas de estos resultados sería que Plek no interaccionara directamente con los filamentos de actina. En cambio, regularía otras proteínas relacionadas con la polimerización, silenciadas en las

células MEL-R. Por lo tanto, la sola expresión de pleckstrina en células resistentes no sería suficiente para ejercer la función como regulador del citoesqueleto. Un posible candidato es la moesina cuya interacción con pleckstrina se ha demostrado en plaquetas mediante inmunoprecipitación y GST *pulldown* (Baig et al. 2009). La moesina junto a otras proteínas (ezrina y radixina) forman la familia ERM que organizan los dominios de membrana y regulan las vías de traducción de señales mediante la interacción con el citoesqueleto (Fehon et al. 2010). Las ERM actúan sobre las GTPasas RhoA regulando el citoesqueleto de actina cortical en *Drosophila melanogaster* y cultivos celulares S2 (Speck et al. 2003; Carreno et al. 2008). Curiosamente, la expresión de moesina disminuye en MEL-R con respecto a MEL-DS19 (FPKM de 44,32 y 145,09 en MEL-R y MEL-DS19, respectivamente), según datos del ARN-seq que no han sido comentados en los resultados.

5.7. Was y Plek, reguladores de Btk

En el presente trabajo se ha visto que la expresión ectópica de Was en las células resistentes induce la expresión génica de *Btk*. Estudios anteriores realizados en la línea celular K562 han llegado a resultados similares observándose cambios en la expresión de varios grupos de genes cuando se sobreexpresa Was (Looi et al. 2014). En linfocitos T (T_H1), asimismo se ha observado que Was regula la expresión del gen *TBX21* promoviendo la trimetilación de la lisina 4, 9 o 36 de la histona H3 (H3K4, H3K9 o H3K36) (Taylor et al. 2010). Estos datos demuestran la relevancia de Was como regulador de la expresión génica. Por otra parte, nuestros resultados han demostrado que la expresión de Plek en la línea celular MEL-R, también provoca el desbloqueo del silenciamiento génico de *Btk*. Este dato revela una nueva función de la pleckstrina como regulador transcripcional desconocida hasta el momento.

En conjunto nuestros resultados demuestran que Was y Plek corriente arriba en la transcripción de *Btk*. Como se ha descrito en apartados anteriores Btk promueve la activación proteica de Was. Estos datos sugieren una posible regulación coordinada entre Was y Btk a través de un *feedback* que modularía los niveles de ambas proteínas.

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral ponen de manifiesto la relevancia del citoesqueleto de actina en las células eritropoyéticas cuya importancia es si cabe mayor, ya que la correcta organización y polimerización de los filamentos es esencial en el proceso de enucleación en las etapas tardías de diferenciación celular.

Por otra parte, se ha demostrado que el uso de líneas celulares resistentes son esenciales en el estudio de los procesos implicados en el bloqueo de la diferenciación celular. El avance en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares permitiría el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas más eficientes en los tratamientos antitumorales.

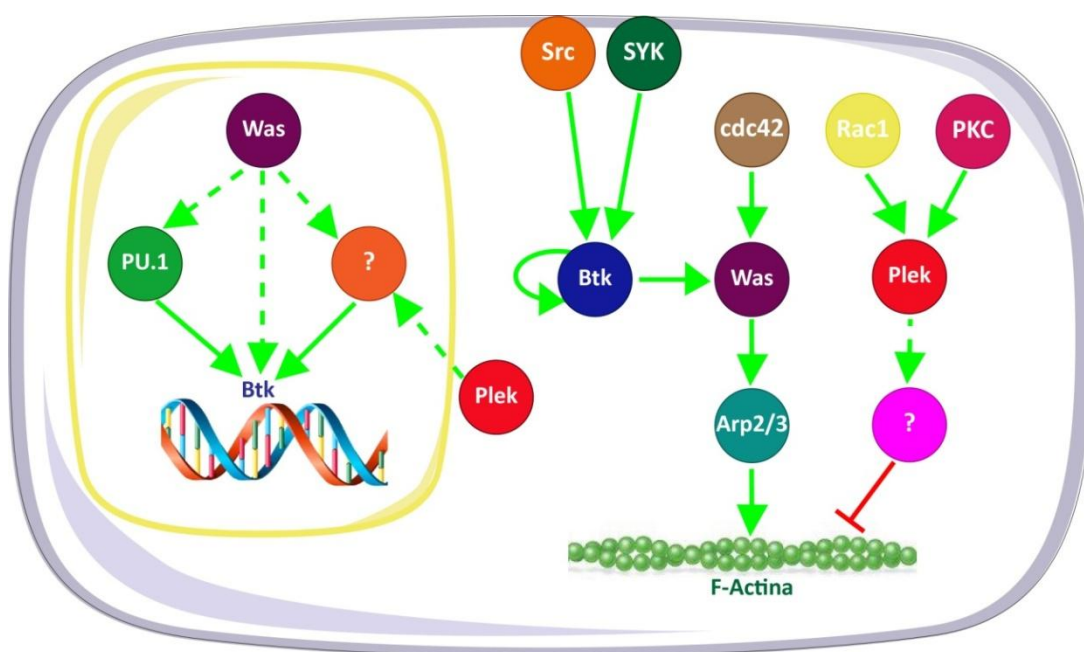


Figura 49. Esquema de la red de proteínas implicadas en la polimerización de actina en células eritroleucémicas. El rectángulo azul y amarillo representa la membrana celular y nuclear respectivamente. Cada círculo simboliza una proteína distinta y en el núcleo se muestra el gen de *Btk*. Las flechas verdes y la línea roja terminada en una barra indican la activación o represión de la proteína en cada caso, mientras que la flecha en curva constituye una autoactivación. Las líneas discontinuas sugieren posibles interacciones que no se han demostrado experimentalmente.

6. Conclusiones

1. Se ha demostrado que la tetraploidía es una característica de las líneas celulares resistentes MEL-R, independiente de la presión selectiva del agente inductor de la diferenciación.
2. Se ha constatado que las células resistentes MEL-R presentan un silenciamiento génico generalizado respecto a la línea eritroleucémica parental.
3. Se ha comprobado que la reducción de la actividad transcripcional de las células resistentes es consecuencia de varios mecanismos entre los que se encuentran el incremento de la heterocromatina y la metilación de promotores favorecida por un aumento de la ADN metiltransferasa Dnmt1 y una disminución de la demetilasa Tet3.
4. Se ha demostrado que un grupo de genes específicos del linaje hematopoyético implicados en la regulación y organización del citoesqueleto de actina entre los cuales destacan *Was*, *Btk*, *Plek*, *Arhgef10l*, *Rac2*, *Dock2* y *Nckap1l* está silenciado en la línea resistente MEL-R.
5. Se ha constatado que el 16% de los genes con mayor expresión en MEL-R respecto a la línea progenitora MEL DS19 corresponden al grupo que codifican histonas, tanto variantes como de replicación.
6. Se han encontrado evidencias que permiten sugerir que la principal vía de polimerización de actina en las células MEL-DS19 es Was-Arp2/3. Was y Btk actuarían como moduladores positivos favoreciendo la formación de filamentos de actina, mientras que Plek funcionaría como un regulador negativo.
7. Se ha comprobado que Was y Plek modulan la actividad génica de Btk, posiblemente mediante la interacción con otras proteínas reguladoras.
8. En conjunto, estos resultados sugieren que la desregulación de los genes implicados en la regulación y polimerización del citoesqueleto de actina está asociada a la adquisición de un fenotipo resistente a la diferenciación celular.

7. Bibliografía

- Abrams CS, Zhao W, Belmonte E, Brass LF. 1995. Protein kinase C regulates pleckstrin by phosphorylation of sites adjacent to the N-terminal pleckstrin homology domain. *The Journal of biological chemistry* **270**: 23317-23321.
- Abrams CS, Zhao W, Brass LF. 1996. A site of interaction between pleckstrin's PH domains and G beta gamma. *Biochimica et biophysica acta* **1314**: 233-238.
- Affolter M, Cote J, Renaud J, Ruiz-Carrillo A. 1987. Regulation of histone and beta A-globin gene expression during differentiation of chicken erythroid cells. *Molecular and cellular biology* **7**: 3663-3672.
- Anders S, Reyes A, Huber W. 2012. Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. *Genome research* **22**: 2008-2017.
- Antoniou M. 1991. Induction of Erythroid-Specific Expression in Murine Erythroleukemia (MEL) Cell Lines. *Methods in molecular biology* **7**: 421-434.
- Baig A, Bao X, Haslam RJ. 2009. Proteomic identification of pleckstrin-associated proteins in platelets: possible interactions with actin. *Proteomics* **9**: 4254-4258.
- Barrero MJ, Sese B, Marti M, Izpisua Belmonte JC. 2013. Macro histone variants are critical for the differentiation of human pluripotent cells. *The Journal of biological chemistry* **288**: 16110-16116.
- Bartova E, Pachernik J, Kozubik A, Kozubek S. 2007. Differentiation-specific association of HP1alpha and HP1beta with chromocentres is correlated with clustering of TIF1beta at these sites. *Histochem Cell Biol* **127**: 375-388.
- Bauer DE, Canver MC, Orkin SH. 2015. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Baylin SB. 2005. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature clinical practice Oncology* **2 Suppl 1**: S4-11.
- Bing Li MC, and Jerry L. Workman. 2007. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* **128**: 707-719.
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* **16**: 6-21.
- Blundell MP, Bouma G, Metelo J, Worth A, Calle Y, Cowell LA, Westerberg LS, Moulding DA, Mirando S, Kinnon C et al. 2009. Phosphorylation of WASp is a key regulator of activity and stability in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 15738-15743.

- Blundell MP, Worth A, Bouma G, Thrasher AJ. 2010. The Wiskott-Aldrich syndrome: The actin cytoskeleton and immune cell function. *Dis Markers* **29**: 157-175.
- Bonisch C, Hake SB. 2012. Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic acids research* **40**: 10719-10741.
- Brown DT. 2001. Histone variants: are they functionally heterogeneous? *Genome biology* **2**: REVIEWS0006.
- Bubb MR, Senderowicz AM, Sausville EA, Duncan KL, Korn ED. 1994. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *The Journal of biological chemistry* **269**: 14869-14871.
- Burda P, Laslo P, Stopka T. 2010. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia* **24**: 1249-1257.
- Buschbeck M, Uribealago I, Wibowo I, Rue P, Martin D, Gutierrez A, Morey L, Guigo R, Lopez-Schier H, Di Croce L. 2009. The histone variant macroH2A is an epigenetic regulator of key developmental genes. *Nature structural & molecular biology* **16**: 1074-1079.
- Campellone KG, Webb NJ, Znameroski EA, Welch MD. 2008. WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell* **134**: 148-161.
- Campellone KG, Welch MD. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 237-251.
- Caron E. 2002. Regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and related molecules. *Current opinion in cell biology* **14**: 82-87.
- Carreno S, Kouranti I, Glusman ES, Fuller MT, Echard A, Payre F. 2008. Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *The Journal of cell biology* **180**: 739-746.
- Catucci M, Castiello MC, Pala F, Bosticardo M, Villa A. 2012. Autoimmunity in wiskott-Aldrich syndrome: an unsolved enigma. *Front Immunol* **3**: 209.
- Civera C, Simon B, Stier G, Sattler M, Macias MJ. 2005. Structure and dynamics of the human pleckstrin DEP domain: distinct molecular features of a novel DEP domain subfamily. *Proteins* **58**: 354-366.
- Cmarik JL, Hegamyer G, Gerrard B, Dean M, Colburn NH. 2000. cDNA cloning and mapping of mouse pleckstrin (Plek), a gene upregulated in transformation-resistant cells. *Genomics* **66**: 204-212.

- Cooper JA. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology* **105**: 1473-1478.
- Cory GO, Garg R, Cramer R, Ridley AJ. 2002. Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *The Journal of biological chemistry* **277**: 45115-45121.
- Coward J, Harding A. 2014. Size Does Matter: Why Polyploid Tumor Cells are Critical Drug Targets in the War on Cancer. *Frontiers in oncology* **4**: 123.
- Crispino LCDaJD. 2011. Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood* **118**: 231-239.
- Chen G, Rubinstein B, Li R. 2012. Whole chromosome aneuploidy: big mutations drive adaptation by phenotypic leap. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **34**: 893-900.
- Chen P, Zhao J, Li G. 2013. Histone variants in development and diseases. *J Genet Genomics* **40**: 355-365.
- Christie DA, Xu LS, Turkistany SA, Solomon LA, Li SK, Yim E, Welch I, Bell GI, Hess DA, DeKoter RP. 2015. PU.1 opposes IL-7-dependent proliferation of developing B cells with involvement of the direct target gene bruton tyrosine kinase. *Journal of immunology* **194**: 595-605.
- de la Rica L, Rodriguez-Ubreva J, Garcia M, Islam AB, Urquiza JM, Hernando H, Christensen J, Helin K, Gomez-Vaquero C, Ballestar E. 2013. PU.1 target genes undergo Tet2-coupled demethylation and DNMT3b-mediated methylation in monocyte-to-osteoclast differentiation. *Genome biology* **14**: R99.
- Derry JM, Ochs HD, Francke U. 1994. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **79**: following 922.
- Desouza M, Gunning PW, Stehn JR. 2012. The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. *Bioarchitecture* **2**: 75-87.
- Ding Y, Kantarci A, Badwey JA, Hasturk H, Malabanan A, Van Dyke TE. 2007. Phosphorylation of pleckstrin increases proinflammatory cytokine secretion by mononuclear phagocytes in diabetes mellitus. *Journal of immunology* **179**: 647-654.
- Dobbs K, Dominguez Conde C, Zhang SY, Parolini S, Audry M, Chou J, Haapaniemi E, Keles S, Bilic I, Okada S et al. 2015. Inherited DOCK2 Deficiency in Patients with Early-Onset Invasive Infections. *The New England journal of medicine* **372**: 2409-2422.

- Doenecke D, Albig W, Bouterfa H, Drabent B. 1994. Organization and expression of H1 histone and H1 replacement histone genes. *Journal of cellular biochemistry* **54**: 423-431.
- Dominguez R, Holmes KC. 2011. Actin structure and function. *Annual review of biophysics* **40**: 169-186.
- Dovas A, Cox D. 2010. Regulation of WASp by phosphorylation: Activation or other functions? *Communicative & integrative biology* **3**: 101-105.
- Dzierzak E, Philipsen S. 2013. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **3**: a011601.
- Eissenberg JC, Elgin SC. 2014. HP1a: a structural chromosomal protein regulating transcription. *Trends in genetics : TIG* **30**: 103-110.
- Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. 2010. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 276-287.
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, Sanz G, List AF, Gore S, Seymour JF et al. 2010. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**: 562-569.
- Fernandez-Nestosa MJ, Hernandez P, Schwartzman JB, Krimer DB. 2008. PU.1 is dispensable to block erythroid differentiation in Friend erythroleukemia cells. *Leuk Res* **32**: 121-130.
- Fernandez-Nestosa MJ, Monturus E, Sanchez Z, Torres FS, Fernandez AF, Fraga MF, Hernandez P, Schwartzman JB, Krimer DB. 2013. DNA methylation-mediated silencing of PU.1 in leukemia cells resistant to cell differentiation. *Springerplus* **2**: 392.
- Fiedler K, Sindrilaru A, Terszowski G, Kokai E, Feyerabend TB, Bullinger L, Rodewald HR, Brunner C. 2011. Neutrophil development and function critically depend on Bruton tyrosine kinase in a mouse model of X-linked agammaglobulinemia. *Blood* **117**: 1329-1339.
- Fine N, Khaliq S, Hassanpour S, Glogauer M. 2016. Role of the Cytoskeleton in Myeloid Cell Function. *Microbiology spectrum* **4**.
- Friend C, Patuleia MC, De Harven E. 1966. Erythrocytic maturation in vitro of murine (Friend) virus-induced leukemic cells. *Natl Cancer Inst Monogr* **22**: 505-522.

- Frugtniet B, Jiang WG, Martin TA. 2015. Role of the WASP and WAVE family proteins in breast cancer invasion and metastasis. *Breast cancer* **7**: 99-109.
- Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D. 2005. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* **437**: 1043-1047.
- Fukui Y, Hashimoto O, Sanui T, Oono T, Koga H, Abe M, Inayoshi A, Noda M, Oike M, Shirai T et al. 2001. Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* **412**: 826-831.
- Gailani D, Fisher TC, Mills DC, Macfarlane DE. 1990. P47 phosphoprotein of blood platelets (pleckstrin) is a major target for phorbol ester-induced protein phosphorylation in intact platelets, granulocytes, lymphocytes, monocytes and cultured leukaemic cells: absence of P47 in non-haematopoietic cells. *British journal of haematology* **74**: 192-202.
- Gan Q, Chepelev I, Wei G, Tarayrah L, Cui K, Zhao K, Chen X. 2010. Dynamic regulation of alternative splicing and chromatin structure in Drosophila gonads revealed by RNA-seq. *Cell research* **20**: 763-783.
- Garcia-Sacristan A, Fernandez-Nestosa MJ, Hernandez P, Schwartzman JB, Krimer DB. 2005. Protein kinase clk/STY is differentially regulated during erythroleukemia cell differentiation: a bias toward the skipped splice variant characterizes postcommitment stages. *Cell research* **15**: 495-503.
- Gnanapragasam MN, McGrath KE, Catherman S, Xue L, Palis J, Bieker JJ. 2016. EKLF/KLF1-regulated cell cycle exit is essential for erythroblast enucleation. *Blood* **128**: 1631-1641.
- Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S, Dewell S, Law M, Guo X, Li X et al. 2010. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* **140**: 678-691.
- Grzanka D, Gagat M, Izdebska M. 2013. Actin is required for cellular death. *Acta histochemica* **115**: 775-782.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- . 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.
- Haouala A, Widmer N, Duchosal MA, Montemurro M, Buclin T, Decosterd LA. 2011. Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood* **117**: e75-87.
- Happel N, Doenecke D. 2009. Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* **431**: 1-12.

- Haslam RJ, Lynham JA, Fox JE. 1979. Effects of collagen, ionophore A23187 and prostaglandin E1 on the phosphorylation of specific proteins in blood platelets. *The Biochemical journal* **178**: 397-406.
- Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. 2014. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nature reviews Cancer* **14**: 219-232.
- Henson JH. 1999. Relationships between the actin cytoskeleton and cell volume regulation. *Microscopy research and technique* **47**: 155-162.
- Himmelfmann A, Thevenin C, Harrison K, Kehrl JH. 1996. Analysis of the Bruton's tyrosine kinase gene promoter reveals critical PU.1 and SP1 sites. *Blood* **87**: 1036-1044.
- Hiragami-Hamada K, Shinmyozu K, Hamada D, Tatsu Y, Uegaki K, Fujiwara S, Nakayama J. 2011. N-terminal phosphorylation of HP1{alpha} promotes its chromatin binding. *Molecular and cellular biology* **31**: 1186-1200.
- Horwood NJ, Page TH, McDaid JP, Palmer CD, Campbell J, Mahon T, Brennan FM, Webster D, Foxwell BM. 2006. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production. *Journal of immunology* **176**: 3635-3641.
- Hsieh FF, Barnett LA, Green WF, Freedman K, Matushansky I, Skoultschi AI, Kelley LL. 2000. Cell cycle exit during terminal erythroid differentiation is associated with accumulation of p27(Kip1) and inactivation of cdk2 kinase. *Blood* **96**: 2746-2754.
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**: 1262-1278.
- Hu MH, Bauman EM, Roll RL, Yeilding N, Abrams CS. 1999. Pleckstrin 2, a widely expressed paralog of pleckstrin involved in actin rearrangement. *The Journal of biological chemistry* **274**: 21515-21518.
- Iland HJ, Bradstock K, Supple SG, Catalano A, Collins M, Hertzberg M, Browett P, Grigg A, Firkin F, Hugman A et al. 2012. All-trans-retinoic acid, idarubicin, and IV arsenic trioxide as initial therapy in acute promyelocytic leukemia (APML4). *Blood* **120**: 1570-1580; quiz 1752.
- Illidge TM, Cragg MS, Fringes B, Olive P, Erenpreisa JA. 2000. Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage. *Cell biology international* **24**: 621-633.
- Izzo A, Kamieniarz K, Schneider R. 2008. The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biological chemistry* **389**: 333-343.

- Ji P, Jayapal SR, Lodish HF. 2008. Enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts requires Rac GTPases and mDia2. *Nature cell biology* **10**: 314-321.
- Ji P, Murata-Hori M, Lodish HF. 2011. Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation. *Trends in cell biology* **21**: 409-415.
- Ji P, Yeh V, Ramirez T, Murata-Hori M, Lodish HF. 2010. Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. *Haematologica* **95**: 2013-2021.
- Kamakaka RT, Biggins S. 2005. Histone variants: deviants? *Genes & development* **19**: 295-310.
- Kawakami Y, Inagaki N, Salek-Ardakani S, Kitaura J, Tanaka H, Nagao K, Kawakami Y, Xiao W, Nagai H, Croft M et al. 2006. Regulation of dendritic cell maturation and function by Bruton's tyrosine kinase via IL-10 and Stat3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 153-158.
- Keller G. 2005. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & development* **19**: 1129-1155.
- Khaitlina SY. 2001. Functional specificity of actin isoforms. *International review of cytology* **202**: 35-98.
- Kim MH, Kim J, Hong H, Lee SH, Lee JK, Jung E, Kim J. 2016. Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. *The EMBO journal* **35**: 462-478.
- Kiyokawa H, Richon VM, Venta-Perez G, Rifkind RA, Marks PA. 1993. Hexamethylenebisacetamide-induced erythroleukemia cell differentiation involves modulation of events required for cell cycle progression through G1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 6746-6750.
- Kohli RM, Zhang Y. 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **502**: 472-479.
- Krimer DB, Cheng G, Skoultschi AI. 1993. Induction of H3.3 replacement histone mRNAs during the precommitment period of murine erythroleukemia cell differentiation. *Nucleic acids research* **21**: 2873-2879.
- Kurusu S, Takenawa T. 2009. The WASP and WAVE family proteins. *Genome biology* **10**: 226.

- Lane AA, Chabner BA. 2009. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 5459-5468.
- Lane J, Martin T, Weeks HP, Jiang WG. 2014. Structure and role of WASP and WAVE in Rho GTPase signalling in cancer. *Cancer genomics & proteomics* **11**: 155-165.
- Le Clainche C, Carlier MF. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews* **88**: 489-513.
- Lee CR, Cervi D, Truong AH, Li YJ, Sarkar A, Ben-David Y. 2003. Friend virus-induced erythroleukemias: a unique and well-defined mouse model for the development of leukemia. *Anticancer Res* **23**: 2159-2166.
- Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. 2009. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes & development* **23**: 2461-2477.
- Lemmon MA, Ferguson KM, Abrams CS. 2002. Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS letters* **513**: 71-76.
- Li JP, D'Andrea AD, Lodish HF, Baltimore D. 1990. Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. *Nature* **343**: 762-764.
- Li LC, Dahiya R. 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* **18**: 1427-1431.
- Li M, Fang Y. 2015. Histone variants: the artists of eukaryotic chromatin. *Science China Life sciences* **58**: 232-239.
- Li Z, Cai X, Cai CL, Wang J, Zhang W, Petersen BE, Yang FC, Xu M. 2011. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* **118**: 4509-4518.
- Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, Sugiyama D. 2013. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* **4**: 71.
- Lin CJ, Conti M, Ramalho-Santos M. 2013. Histone variant H3.3 maintains a decondensed chromatin state essential for mouse preimplantation development. *Development*.
- Linardopoulou EV, Parghi SS, Friedman C, Osborn GE, Parkhurst SM, Trask BJ. 2007. Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS genetics* **3**: e237.

- Liu C, Fallen MK, Miller H, Upadhyaya A, Song W. 2013a. The actin cytoskeleton coordinates the signal transduction and antigen processing functions of the B cell antigen receptor. *Frontiers in biology* **8**: 475-485.
- Liu J, Zhang J, Ginzburg Y, Li H, Xue F, De Franceschi L, Chasis JA, Mohandas N, An X. 2013b. Quantitative analysis of murine terminal erythroid differentiation in vivo: novel method to study normal and disordered erythropoiesis. *Blood* **121**: e43-49.
- Lodish B, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. 2005. *Biología Celular y Molecular*.
- Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Satoh M, Hakozaki I, Uchiyama M, Wong WF, Du W, Uchiyama T, Kumaki S et al. 2014. The open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells. *Int Immunol*.
- Ma AD, Abrams CS. 1999. Pleckstrin induces cytoskeletal reorganization via a Rac-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* **274**: 28730-28735.
- Ma AD, Brass LF, Abrams CS. 1997. Pleckstrin associates with plasma membranes and induces the formation of membrane projections: requirements for phosphorylation and the NH₂-terminal PH domain. *The Journal of cell biology* **136**: 1071-1079.
- MacLean AL, Lo Celso C, Stumpf MP. 2016. Stem Cell Population Biology: Insights from Haematopoiesis. *Stem cells*.
- Maffucci T, Falasca M. 2001. Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism. *FEBS letters* **506**: 173-179.
- Margolis RL. 2005. Tetraploidy and tumor development. *Cancer cell* **8**: 353-354.
- Marks PA, Richon VM, Kiyokawa H, Rifkind RA. 1994. Inducing differentiation of transformed cells with hybrid polar compounds: a cell cycle-dependent process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 10251-10254.
- Marks PA, Rifkind RA. 1978. Erythroleukemic differentiation. *Annu Rev Biochem* **47**: 419-448.
- Marks PA, Xu WS. 2009. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *Journal of cellular biochemistry* **107**: 600-608.
- Marzluff WF, Gongidi P, Woods KR, Jin J, Maltais LJ. 2002. The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* **80**: 487-498.

- Mattila PK, Batista FD, Treanor B. 2016. Dynamics of the actin cytoskeleton mediates receptor cross talk: An emerging concept in tuning receptor signaling. *The Journal of cell biology* **212**: 267-280.
- Mitra A, Mishra L, Li S. 2013. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends in biotechnology* **31**: 347-354.
- Mohamed AJ, Yu L, Backesjo CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, Christensson B, Berglof A, Vihinen M, Nore BF et al. 2009. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunological reviews* **228**: 58-73.
- Morceau F, Chateauvieux S, Gaigneaux A, Dicato M, Diederich M. 2013. Long and Short Non-Coding RNAs as Regulators of Hematopoietic Differentiation. *Int J Mol Sci* **14**: 14744-14770.
- Moreau-Gachelin F. 2008. Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation. *Retrovirology* **5**: 99.
- Moreau-Gachelin F, Tavitian A, Tambourin P. 1988. Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* **331**: 277-280.
- Mukhopadhyay S, Ramars AS, Dash D. 2001. Bruton's tyrosine kinase associates with the actin-based cytoskeleton in activated platelets. *Journal of cellular biochemistry* **81**: 659-665.
- Muller S, Sideras P, Smith CI, Xanthopoulos KG. 1996. Cell specific expression of human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene (Btk) is regulated by Sp1- and Spi-1/PU.1-family members. *Oncogene* **13**: 1955-1964.
- Muramatsu D, Singh PB, Kimura H, Tachibana M, Shinkai Y. 2013. Pericentric heterochromatin generated by HP1 interaction-defective histone methyltransferase Suv39h1. *The Journal of biological chemistry*.
- Muszynski KW, Ohashi T, Hanson C, Ruscetti SK. 1998. Both the polycythemia- and anemia-inducing strains of Friend spleen focus-forming virus induce constitutive activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of virology* **72**: 919-925.
- Neri F, Krepelova A, Incarnato D, Maldotti M, Parlato C, Galvagni F, Matarese F, Stunnenberg HG, Oliviero S. 2013. Dnmt3L antagonizes DNA methylation at bivalent promoters and favors DNA methylation at gene bodies in ESCs. *Cell* **155**: 121-134.
- Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H, Graf T. 2000. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* **95**: 2543-2551.

- Nguyen TV, Sleiman M, Moriarty T, Herrick WG, Peyton SR. 2014. Sorafenib resistance and JNK signaling in carcinoma during extracellular matrix stiffening. *Biomaterials* **35**: 5749-5759.
- Nishigaki K, Hanson C, Ohashi T, Thompson D, Muszynski K, Ruscetti S. 2000. Erythroid cells rendered erythropoietin independent by infection with Friend spleen focus-forming virus show constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase: involvement of insulin receptor substrate-related adapter proteins. *Journal of virology* **74**: 3037-3045.
- Nowak D, Stewart D, Koeffler HP. 2009. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood* **113**: 3655-3665.
- Nurnberg A, Kitzing T, Grosse R. 2011. Nucleating actin for invasion. *Nature reviews Cancer* **11**: 177-187.
- Ochs HD, Thrasher AJ. 2006. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* **117**: 725-738; quiz 739.
- Ogawa M. 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* **81**: 2844-2853.
- Pedersen SF, Hoffmann EK, Mills JW. 2001. The cytoskeleton and cell volume regulation. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* **130**: 385-399.
- Petro JB, Rahman SM, Ballard DW, Khan WN. 2000. Bruton's tyrosine kinase is required for activation of I κ B kinase and nuclear factor κ B in response to B cell receptor engagement. *The Journal of experimental medicine* **191**: 1745-1754.
- Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F. 1995. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* **121**: 163-172.
- Pilo Boyl P, Di Nardo A, Mulle C, Sassoe-Pognetto M, Panzanelli P, Mele A, Kneussel M, Costantini V, Perlas E, Massimi M et al. 2007. Profilin2 contributes to synaptic vesicle exocytosis, neuronal excitability, and novelty-seeking behavior. *The EMBO journal* **26**: 2991-3002.
- Plass C, Pfister SM, Lindroth AM, Bogatyrova O, Claus R, Lichter P. 2013. Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nature reviews Genetics* **14**: 765-780.
- Ponting CP, Bork P. 1996. Pleckstrin's repeat performance: a novel domain in G-protein signaling? *Trends in biochemical sciences* **21**: 245-246.

- Qiu Y, Kung HJ. 2000. Signaling network of the Btk family kinases. *Oncogene* **19**: 5651-5661.
- Quek LS, Bolen J, Watson SP. 1998. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Current biology : CB* **8**: 1137-1140.
- Rattray AM, Muller B. 2012. The control of histone gene expression. *Biochemical Society transactions* **40**: 880-885.
- Rebucci M, Michiels C. 2013. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical pharmacology* **85**: 1219-1226.
- Reddington JP, Pennings S, Meehan RR. 2013. Non-canonical functions of the DNA methylome in gene regulation. *The Biochemical journal* **451**: 13-23.
- Rekhtman N, Radparvar F, Evans T, Skoultchi AI. 1999. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes & development* **13**: 1398-1411.
- Reuben RC, Wife RL, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. 1976. A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 862-866.
- Reuter S, Gupta SC, Park B, Goel A, Aggarwal BB. 2011. Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. *Genes Nutr* **6**: 93-108.
- Rivella S. 2014. Enucleate or replicate? Ask the cytoskeleton. *Blood* **123**: 601-602.
- Rodnick-Smith M, Luan Q, Liu SL, Nolen BJ. 2016. Role and structural mechanism of WASP-triggered conformational changes in branched actin filament nucleation by Arp2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: E3834-3843.
- Rollason R, Wherlock M, Heath JA, Heesom KJ, Saleem MA, Welsh GI. 2016. Disease causing mutations in inverted formin 2 regulate its binding to G-actin, F-actin capping protein (CapZ alpha-1) and profilin 2. *Bioscience reports* **36**: e00302.
- Ruscetti JCaS. 2010. Friend Spleen Focus-Forming Virus Activates the Tyrosine Kinase sf-Stk and the Transcription Factor PU.1 to Cause a Multi-Stage Erythroleukemia in Mice. *Viruses* **2**: 2235-2257.
- Ruscetti SK. 1995. *Erythroleukaemia induction by the Friend spleen focus-forming virus*.
- Ruscetti SK. 1999. Deregulation of erythropoiesis by the Friend spleen focus-forming virus. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 1089-1109.

- Sadhukhan S, Sarkar K, Taylor M, Candotti F, Vyas YM. 2014. Nuclear role of WASp in gene transcription is uncoupled from its ARP2/3-dependent cytoplasmic role in actin polymerization. *Journal of immunology* **193**: 150-160.
- Sanui T, Inayoshi A, Noda M, Iwata E, Stein JV, Sasazuki T, Fukui Y. 2003. DOCK2 regulates Rac activation and cytoskeletal reorganization through interaction with ELMO1. *Blood* **102**: 2948-2950.
- Schmidt U, van den Akker E, Parren-van Amelsvoort M, Litos G, de Bruijn M, Gutierrez L, Hendriks RW, Ellmeier W, Lowenberg B, Beug H et al. 2004. Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in erythroid progenitors. *The Journal of experimental medicine* **199**: 785-795.
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* **3**: 1101-1108.
- Sharma S, Orlowski G, Song W. 2009. Btk regulates B cell receptor-mediated antigen processing and presentation by controlling actin cytoskeleton dynamics in B cells. *Journal of immunology* **182**: 329-339.
- Sharma S, Santiskulvong C, Rao J, Gimzewski JK, Dorigo O. 2014. The role of Rho GTPase in cell stiffness and cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* **6**: 611-617.
- Shearstone JR, Pop R, Bock C, Boyle P, Meissner A, Socolovsky M. 2011. Global DNA demethylation during mouse erythropoiesis in vivo. *Science* **334**: 799-802.
- Singh RK, Liang D, Gajjalaiahvari UR, Kabbaj MH, Paik J, Gunjan A. 2010. Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms. *Cell cycle* **9**: 4236-4244.
- Skene PJ, Henikoff S. 2013. Histone variants in pluripotency and disease. *Development* **140**: 2513-2524.
- Speck O, Hughes SC, Noren NK, Kulikaukas RM, Fehon RG. 2003. Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature* **421**: 83-87.
- Spiro C, Gliniak B, Kabat D. 1988. A tagged helper-free Friend virus causes clonal erythroblast immortality by specific proviral integration in the cellular genome. *Journal of virology* **62**: 4129-4135.
- Stopka T, Amanatullah DF, Papetti M, Skoultchi AI. 2005. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *The EMBO journal* **24**: 3712-3723.

- Storchova Z, Pellman D. 2004. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**: 45-54.
- Takenawa T, Suetsugu S. 2007. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 37-48.
- Takeshita H, Kusuzaki K, Ashihara T, Gebhardt MC, Mankin HJ, Hirasawa Y. 1998. Actin organization associated with the expression of multidrug resistant phenotype in osteosarcoma cells and the effect of actin depolymerization on drug resistance. *Cancer letters* **126**: 75-81.
- Talbert PB, Henikoff S. 2010. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 264-275.
- Tang YN, Ding WQ, Guo XJ, Yuan XW, Wang DM, Song JG. 2015. Epigenetic regulation of Smad2 and Smad3 by profilin-2 promotes lung cancer growth and metastasis. *Nature communications* **6**: 8230.
- Taylor MD, Sadhukhan S, Kottangada P, Ramgopal A, Sarkar K, D'Silva S, Selvakumar A, Candotti F, Vyas YM. 2010. Nuclear role of WASp in the pathogenesis of dysregulated TH1 immunity in human Wiskott-Aldrich syndrome. *Science translational medicine* **2**: 37ra44.
- Thrasher AJ. 2002. WASp in immune-system organization and function. *Nature reviews Immunology* **2**: 635-646.
- Thrasher AJ, Burns SO. 2010. WASP: a key immunological multitasker. *Nature reviews Immunology* **10**: 182-192.
- Todaro GJ, Green H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology* **17**: 299-313.
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* **7**: 562-578.
- Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, Sparkes RS, Kubagawa H, Mohandas T, Quan S et al. 1993. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* **72**: 279-290.
- Tyler JJ, Allwood EG, Ayscough KR. 2016. WASP family proteins, more than Arp2/3 activators. *Biochemical Society transactions* **44**: 1339-1345.

- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* **40**: e115.
- van Riel B, Rosenbauer F. 2014. Epigenetic control of hematopoiesis: the PU.1 chromatin connection. *Biological chemistry* **395**: 1265-1274.
- Vanegas N, Garcia-Sacristan A, Lopez-Fernandez LA, Parraga M, del Mazo J, Hernandez P, Schvartzman JB, Krimer DB. 2003. Differential expression of Ran GTPase during HMBA-induced differentiation in murine erythroleukemia cells. *Leuk Res* **27**: 607-615.
- Vardabasso C, Hasson D, Ratnakumar K, Chung CY, Duarte LF, Bernstein E. 2013. Histone variants: emerging players in cancer biology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- . 2014. Histone variants: emerging players in cancer biology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **71**: 379-404.
- Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, Hammarstrom L, Kinnon C, Levinsky R, Bobrow M et al. 1993. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* **361**: 226-233.
- Vijayakumar V, Monypenny J, Chen XJ, Machesky LM, Lilla S, Thrasher AJ, Anton IM, Calle Y, Jones GE. 2015. Tyrosine phosphorylation of WIP releases bound WASP and impairs podosome assembly in macrophages. *Journal of cell science* **128**: 251-265.
- Ward J, Jr. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* **8**: 236-244.
- Weaver BA, Cleveland DW. 2006. Does aneuploidy cause cancer? *Current opinion in cell biology* **18**: 658-667.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, Schubeler D. 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics* **39**: 457-466.
- Wiskott A. 1937. Familiarer,angeboren Morbus Werhofi? Monatschrift Kinderheil. **68**: 212-216.
- Wong P, Hattangadi SM, Cheng AW, Frampton GM, Young RA, Lodish HF. 2011. Gene induction and repression during terminal erythropoiesis are mediated by distinct epigenetic changes. *Blood* **118**: e128-138.

- Wu H, Zhang Y. 2014. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* **156**: 45-68.
- Yang X, Sun L, Ghosh S, Rao AK. 1996. Human platelet signaling defect characterized by impaired production of inositol-1,4,5-triphosphate and phosphatidic acid and diminished Pleckstrin phosphorylation: evidence for defective phospholipase C activation. *Blood* **88**: 1676-1683.
- Yu Y, Mo Y, Ebenezer D, Bhattacharyya S, Liu H, Sundaravel S, Giricz O, Wontakal S, Cartier J, Caces B et al. 2013. High resolution methylome analysis reveals widespread functional hypomethylation during adult human erythropoiesis. *The Journal of biological chemistry* **288**: 8805-8814.
- Zhao B, Keerthivasan G, Mei Y, Yang J, McElherne J, Wong P, Doench J, Feng G, Root D, Ji P. 2014. Targeted shRNA screening identified critical roles of pleckstrin-2 in erythropoiesis. *Haematologica*.
- Zhao B, Mei Y, Schipma MJ, Roth EW, Bleher R, Rappoport JZ, Wickrema A, Yang J, Ji P. 2016. Nuclear Condensation during Mouse Erythropoiesis Requires Caspase-3-Mediated Nuclear Opening. *Developmental cell* **36**: 498-510.
- Zuchero JB, Coutts AS, Quinlan ME, Thangue NB, Mullins RD. 2009. p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nature cell biology* **11**: 451-459.

8. Anexo

Differential gene expression analysis by RNA-seq reveals the importance of actin cytoskeletal proteins in leukemia cells

Vanessa Fernández-Calleja¹, Pablo Hernández¹, Jorge B Schwartzman¹, Dora B Krimer^{Corresp. 1}

¹ Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas, Spanish National Research Council (CSIC), Madrid, Spain

Corresponding Author: Dora B Krimer

Email address: dbkrimer@cib.csic.es

Development of drug resistance limits the effectiveness of anticancer treatments. Understanding the molecular mechanisms triggering this event in tumor cells may lead to improved therapeutic strategies. Here we used RNA-seq to compare the transcriptomes of an erythroleukemia progenitor cell line (MEL-DS19) and a derived cell line with induced resistance to differentiation (MEL-R). RNA-seq analysis identified a total of 596 genes that were differentially expressed by more than two-fold, of which 486 genes were up-regulated in MEL-DS19 cells and 110 up-regulated in MEL-R cells. These observations revealed that the number of genes expressed in the parental cell line decreased as the cells acquired the resistant phenotype. Clustering analysis of a group of genes showing the highest differential expression allowed identification of a sub-group among genes up-regulated in MEL cells. These genes are related with the organization of the actin cytoskeleton network. Moreover, the majority of these genes are preferentially expressed in the hematopoietic lineage and at least three of them, Was (Wiskott Aldrich syndrome), Btk (Bruton tyrosine kinase) and Rac2, when mutated in humans, give rise to severe hematopoietic deficiencies. Among the group of genes that were up-regulated in MEL-R cells, a significant percentage (16%) corresponded to genes coding for histone proteins, both canonical and variants. A potential implication of these results on the blockade of differentiation in resistant cells is discussed.

Title: "Differential Gene Expression Analysis by RNA-seq Reveals the Importance of Actin Cytoskeletal Proteins in Leukemia Cells"

Authors: Vanessa Fernández-Calleja¹, Pablo Hernández¹, Jorge B. Schwartzman¹ and Dora B. Krimer^{1#}

Address: ¹Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040-Madrid, Spain

Running Title: Differential Expression in Leukemia Cells

Key words: RNA-seq / leukemia cells / cell differentiation / HMBA-resistant / cytoskeleton proteins / Wiskott-Aldrich syndrome / Bruton's tyrosine kinase /

#Corresponding author: Dora B. Krimer

Phone: (+34) 91 837 3112 ext. 4238

Fax: (+34) 91 536 0432

E-mail: dbkrimer@cib.csic.es

Abstract

Development of drug resistance limits the effectiveness of anticancer treatments. Understanding the molecular mechanisms triggering this event in tumor cells may lead to improved therapeutic strategies. Here we used RNA-seq to compare the transcriptomes of an erythroleukemia progenitor cell line (MEL-DS19) and a derived cell line with induced resistance to differentiation (MEL-R). RNA-seq analysis identified a total of 596 genes that were differentially expressed by more than two-fold, of which 486 genes were up-regulated in MEL-DS19 cells and 110 up-regulated in MEL-R cells. These observations revealed that the number of genes expressed in the parental cell line decreased as the cells acquired the resistant phenotype. Clustering analysis of a group of genes showing the highest differential expression allowed identification of a sub-group among genes up-regulated in MEL cells. These genes are related with the organization of the actin cytoskeleton network. Moreover, the majority of these genes are preferentially expressed in the hematopoietic lineage and at least three of them, Was (Wiskott Aldrich syndrome), Btk (Bruton tyrosine kinase) and Rac2, when mutated in humans, give rise to severe hematopoietic deficiencies. Among the group of genes that were up-regulated in MEL-R cells, a significant percentage (16%) corresponded to genes coding for histone proteins, both canonical and variants. A potential implication of these results on the blockade of differentiation in resistant cells is discussed.

Introduction

Cancer cells are distinguished from their normal counterparts by several hallmarks, including uncontrolled growth, lack of response to apoptotic signals and blockade of differentiation [1, 2]. These characteristics serve as a framework for testing different protocols aimed to eliminate tumor cells by aggressive chemotherapy or radiotherapy. Alternatively, cancer cells may be forced to resume the process of maturation by differentiation agents, which generally have less toxicity than conventional cancer treatments. An example of a successful clinical application of differentiation therapy is all-trans-retinoic acid (ATRA) for treatment of acute promyelocytic leukemia, which induces terminal differentiation of promyelocytic leukemic cells [3]. Other differentiation-inducing agents, such as histone-deacetylase (HDAC) inhibitors [4], cytidine analogs (e.g., 5'-aza-2'-deoxycytidine) [5], and tyrosine kinase inhibitors (e.g., imatinib) [6] have been less successful in the treatment of leukemias and tumors. An obstacle to all cancer therapy, including ATRA, is the acquisition of drug resistance that develops in response to repeated therapy and inevitably leads to relapse in most patients, forcing the combination of treatments with additional toxic chemotherapy [7].

In vitro differentiation models have proved to be extremely useful to study the molecular events associated with the blockade of cell differentiation exhibited by some tumor cells and the requirements for re-entry into the cell differentiation program. The erythroleukemia model (MEL cells) developed by Friend and colleagues [8] is an outstanding example that remains as a solid platform to evaluate tumor cell reprogramming after more than 40 years since its description.

Friend erythroblasts are derived from mice infected with the Friend complex virus. Insertion of the Friend spleen focus-forming virus (SFFV) several kilobases upstream of the PU.1/Sfpi1 locus initiation start site leads to its constitutive activation, resulting in a block of erythroid differentiation and the development of erythroleukemia. We have previously reported the establishment of hexamethylene bisacetamide (HMBA)-resistant cell lines (MEL-R) after months of MEL cell culture under pressure with the differentiation inducer, resulting in a cell line that retains most of the parental characteristics [9]. Unexpectedly, we found that PU.1/Sfpi1 remains silent even though MEL-R cells do not differentiate, and this silencing persists in the

presence of chemical inducers other than HMBA. Nevertheless, the SFFV integration site maps exactly to the same location both in the parental MEL and in MEL-R cell lines (2,976 bp downstream of the URE distal element). We also showed that inactivation of PU.1/Sfp1 in the resistant MEL-R cell line was mediated by DNA methylation at the promoter near to CpG islands [10]. For all these reasons, we believe MEL-R cells might constitute a useful model to study mechanisms that trigger inducer-resistant cell differentiation. Here we compared the differential expression profiles of MEL and MEL-R cells using RNA-seq to identify sequences potentially involved in the control of HMBA resistance. Our results revealed that a higher proportion of differentially-expressed genes are up-regulated in MEL parental cells than in MEL-R cells, with less than 25% of the up-regulated genes in MEL-R, implying a general decline in gene expression concomitant with the gain of the resistant phenotype. Interestingly, a group of highly up-regulated sequences in MEL cells corresponded to genes encoding actin cytoskeleton proteins, whereas a significant proportion of genes up-regulated in MEL-R cells belonged to histone coding genes. Thus, our results pointed to an involvement of the actin cytoskeleton network associated with the acquisition of resistance to HMBA-induced differentiation. A potential contribution of histone gene expression to the differentiation block is also discussed.

Materials and Methods

Cell cultures and treatment

MEL-DS19 (hereafter called MEL) were obtained from Arthur Skoultschi (Albert Einstein College of Medicine, New York, USA). MEL-resistant (hereafter called MEL-R) derived from MEL-DS19, previously established in our lab. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Gibco). Cell differentiation was induced by exposing logarithmically growing cell cultures to 5 mM HMBA. MEL-R cells were routinely cultured in the presence of the differentiation inducer. Hemoglobinized cells were monitored by determining the proportion of benzidine-staining positive cells (B⁺) in the culture.

RNA isolation and RNA-seq

Total RNA was isolated from 1×10^7 cells using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNase I was used to degrade any possible DNA contamination. In total, 1 mg was used to prepare standard RNA-seq libraries (TruSeq RNA Sample Preparation Kit, Illumina, San Diego, CA) based on polyA⁺ isolation. RNA concentration ranged from 326 to 394 ng/ml, and samples showed optimal integrity with RIN values of 9.80. The libraries had an average length of 337–367 nt and were quantified by quantitative PCR (Kapa Biosystems, Woburn, MA) using a previously quantified library as standard. Samples were loaded onto a lane of a flowcell using the Cluster Station apparatus (Illumina) and sequenced on the Illumina GAIIx platform (Parque Científico de Madrid, Spain) under a single read (1×75) protocol. Reads were quality filtered, producing approximately 25 million and 17 million pass filter reads for MEL and MEL-R libraries, respectively, which were used for further bioinformatics analysis. Sequence reads were mapped to a reference mouse genome (NCBI) with TopHat v2.0.1 and further analyzed by DESeq and Cufflinks v2.0.0 to identify differentially expressed transcripts [11].

Quantitative real-time PCR validation

Quantitative real-time-PCR (qRT-PCR) was used to validate the relative expression of genes selected from the RNA-seq analysis. Total RNA was extracted from 1×10^7 MEL and MEL-R cells as described above. In total, 2 mg of isolated RNA was transcribed to cDNA using random hexamers and 200 U of SuperScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen). Reactions were performed in triplicate using the SYBR Green Supermix (Bio-Rad) on an iQ5 System (Bio-Rad, Hercules, CA). The conditions for the amplification were as follows: pre-denaturing step of 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec and 60°C for 30 sec, and a final ramp step of 1°C/10 sec from 60°C to 94°C. The primer sequences were designed with Primer3 software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) [12] and are listed in S1 Table (for actin cytoskeleton genes), S2 Table (for histone genes) and S3 Table (for methylases and demethylases). Relative gene expression was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method as described [13].

Antibodies and immunoblotting

Control 3T3 fibroblast cells, MEL and MEL-R cells (2.5×10^6) were harvested, washed with PBS and lysed with NP-40 buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 2 mM EDTA) containing protease

inhibitors (all from Sigma). Protein lysates (10–30 mg) were separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes (Bio-Rad). The membranes were incubated with a mouse monoclonal anti- β -actin antibody (1:10000, Sigma) and a rabbit polyclonal anti- α -tubulin antibody (1:1000, ABclonal) followed by five washing steps with T-TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20). Primary antibodies were detected by incubating with HRP-conjugated anti-mouse (1:3000, Santa Cruz) or anti-rabbit IgG (1:1000, DAKO) followed by five cycles of T-TBS washes.

Bisulfite sequencing

The analysis of Btk, Plek and Was promotor regions in MEL, MEL-R and differentiated MEL cells was performed by sodium bisulfite conversion. Genomic DNA from 8×10^4 cells was bisulfite modified using the EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research). Four microlitres of treated DNA was amplified by PCR using primers specific to the bisulfite-converted DNA for each promotor region with ZymoTaq DNA Polymerase (Zymo Research). The conditions for the PCR were as follows: pre-denaturing step of 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec, 55–60°C for 40 sec and 72°C for 40 sec, with a final extension at 72°C for 7 min. The primer sequences were designed using MethPrimer software (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) [14]. The primers are listed in S4 Table. PCR products were resolved in 1% agarose gels followed by sequencing for methylation analysis, which was performed by Secugen SL (CIB, Madrid).

Cell cycle analysis

Cells (2×10^5 – 1×10^6) were harvested and fixed in 70% ethanol at 4°C for 30 min. Fixed cells were washed twice in PBS and stained with propidium iodide/RNase solution (Immunostep) for 15 min at room temperature (RT). Cell cycle analysis was performed on a Coulter XL flow cytometer and DNA content was analyzed with FlowJo software.

Immunocytochemistry and confocal microscopy

Cells were plated on poly-L-lysine coated slides and incubated at 37°C for 30 min. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, permeabilized with 0.1% Triton-X 100 in PBS for 30 min and blocked with 1% bovine serum albumin in PBS/0.1% Triton-X 100 for 1h, all at RT.

Cells were stained with an anti- β -actin antibody (Sigma) for 1h at RT followed by washing twice with PBS. The primary antibody was detected with an Alexa Fluor 568 secondary antibody (Molecular Probes) and 1 μ g/ml DAPI to stain nuclei, for 1h at RT followed by two washes with PBS. Finally, cells were mounted on a cover slip with Prolong Diamond Antifade Mountant reagent (Invitrogen). Fluorescence images were acquired on a Leica TCS SP2 confocal microscope using a 100 \times objective and zoom.

Data access

The raw data files generated by RNA-seq have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (accession no. GSE83567).

Results

Differential gene expression between MEL and MEL-R

We took a genetic approach to identify potential sequences involved in HMBA resistance by using RNA-seq to compare the transcriptomes of MEL and MEL-R cells. The total number of single-end reads generated from each sample was 25 million for MEL and 17 million for MEL-R, 75 nt length in both cases. Samples were further analyzed using the DESeq package for R Statistical Analysis [15]. The trimmed sequencing reads were mapped to the mouse reference genome (Mus_musculus_NCBI_build37.2). Transcript abundance was processed using Cufflinks software suite v2.0.0 [11] and measured as fragments per kb of exon per million fragments mapped (FPKM); the expression level of each transcript was plotted as shown in Fig 1.

Five hundred and ninety-six transcripts were differentially expressed by more than two-fold between MEL and MEL-R cells, of which 486 genes were up-regulated in MEL cells and 110 were up-regulated in MEL-R cells. Values less than two-fold were ignored and matched the gap observed in the curve of Fig 1. Overall, the total number of genes expressed in the parental cell line decreased as the cells acquired the resistant phenotype. We focused our attention on sequences that were highly differentially expressed in MEL relative to MEL-R cells. Fig 2A illustrate the heat map that includes all the genes with a differential expression greater than 2-

fold. An expanded heat map of genes showing highest fold-change values is shown in Fig 2B. PU.1/Sfpi1 was one of the selected genes that, as we demonstrated previously [9], is not expressed in the resistant cell line and served in this case as a positive control for the RNA-seq efficiency.

Searching for common features among the cohort of highly expressed genes in MEL cells, we found that several sequences were implicated in the regulation of the actin cytoskeleton organization. Table 1 lists the groups of genes with the highest expression difference between MEL and MEL-R cell lines. In addition to their relationship with the actin pathway, a good number of these genes were specific to the hematopoietic lineage and at least three of them, WAS (Wiskott Aldrich syndrome), Btk (Bruton tyrosine kinase) and Rac2, when mutated in humans, give rise to severe deficiencies [16-18]. The majority of these genes were mostly linked to the lymphoid or myeloid lineages, and fewer were reported in an erythroid context [19].

From the 110 selected genes whose expression was higher in MEL-R cells than in the progenitor cell line, a large proportion corresponded to genes encoding histone proteins (16%), mostly canonical but also variant histone types. An expanded heat map illustrating the differential gene expression of histones in MEL-R vs MEL cell lines is shown in Fig 2C. Canonical histone proteins H1, H2A, H2B, H3 and H4, are replication-dependent and their expression is coordinated with DNA replication, occurring primarily during the S phase of the cell cycle. There are nonallelic variants mainly of the H1, H2A, H2B and H3 histones that are not restricted in their expression to the S phase and have different physiological roles. Both groups, however, are essential elements of the nucleosome architecture and contribute to chromatin organization. The RNA-seq data revealed differences in the expression of histones that belong to canonical H1, H2A, H2B and H3 groups, and to the variant histones H1f0, H2afx and H3f3b. To understand the significance of the unexpected up-regulation of histone gene expression in MEL-R cells, we compared their DNA content with that of undifferentiated and HMBA-differentiated MEL cells by flow cytometry (Fig 3). We found that the pattern of the major cell cycle phases, G1 vs S vs G2/M, was similar between MEL-R cells and undifferentiated MEL progenitors (MEL-0h). By contrast, differentiated MEL cells (MEL-96h) accumulated at G1, a phenomenon that has been previously observed during MEL cell differentiation [9, 20, 21]. Nevertheless, we

observed that in terms of DNA content, MEL-R cells acquired a tetraploid phenotype as revealed by the shift in DNA content to the right (Fig 3, bottom panel). An increase in the ploidy of MEL-R cell lines might explain the increase in histone gene expression detected by RNA-seq.

Validation of RNA-seq data by qRT-PCR

To validate the results obtained by RNA-seq, we measured the expression fold changes of seven selected genes by qRT-PCR, marked with a red asterisk in Table 1. RNA from MEL cells treated with 5 mM HMBA were included to allow comparison between the undifferentiated and differentiated MEL cells against the resistant MEL-R line. The expression patterns observed in all cases were consistent with the RNA-seq results (Fig 4), confirming the near absence of expression in MEL-R cells. Significant differences were detected, however, when MEL-R cells were compared with MEL cells induced to differentiate with HMBA. Some of the genes such as Was, Rac2, Dock2 or Btk shared a similar expression profile to that obtained in the resistant cell line, showing a tendency toward minimal expression, whereas the expression levels of Plek, Arhgef10l or Nckap1l exhibited either no change or a higher expression than that observed in differentiated cells. These results implied that the gene expression pattern is heterogeneous during differentiation, suggesting that different genes might be involved in distinct pathways, presumably related to cytoskeleton organization.

Validation by qRT-PCR was also performed for histone genes and as before, we included a comparison with HMBA-differentiated MEL cells. The results of the qRT-PCR analysis were in agreement with those of the RNA-seq; in all cases, histone gene expression was higher in MEL-R cells than in MEL cells (Fig 5A), although the difference in the level of expression varied from more than ten-fold (Hist1h2bk) to two-fold (Hist1h2bj). The same pattern was observed between the differentiated (MEL-96h) and undifferentiated samples (Fig 5B). These results ruled out the hypothesis that MEL-R tetraploidy was responsible for histone gene over-expression.

Methylation status of CpG island promoters of Was, Btk and Plek

We have previously demonstrated that PU.1/Sfp1 silencing in MEL-R cells is caused by methylation of nearby CpG islands at its promoter [10]. Moreover, reactivation of silenced

PU.1/Sfp1 occurs after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine, a potent inhibitor of DNA methylation. To investigate whether DNA methylation is responsible for the down-regulation in gene expression, we examined the methylation status of Btk, Was and Plek promoters in undifferentiated and differentiated MEL cells and in MEL-R cells by bisulfite sequencing. We mapped seven CpG islands upstream of the transcriptional start site of Btk and Was (Fig 6A and B) and five in the case of Plek (Fig 6C). Bisulphite sequencing revealed that all the CpG sites were hypomethylated in undifferentiated (0 h) and differentiated (96 h) MEL cells, whereas the promoters remained hypermethylated at all CpG sites in the resistant cell line. Sites 3, 4 and 5 at the Btk promoter were within a highly cytosine-rich region that were converted to thymine after bisulfite treatment, becoming difficult to resolve. We concluded from these experiments that Btk, Was and Plek expression was silenced by promoter methylation in MEL-R cell lines.

To confirm these results, we examined the expression pattern of the enzymes that catalyze DNA methylation (Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b) and those that are involved in demethylation processes (Tet1, Tet2 and Tet3). Quantitative RT-PCR analysis revealed that the level of expression of Dnmt1, the maintenance methylase enzyme, was higher in MEL-R cells than in undifferentiated or differentiated MEL cells, whereas minimal changes were detected for the de novo methylases Dnmt3a and Dnmt3b between the different cell populations (Fig 7). By contrast, expression of Tet3, but not Tet1 and Tet2 (enzymes involved in methyl group removal), was markedly reduced in MEL-R cells (Fig 7). These results showed that the increase in DNA methylation by Dnmt1 in MEL-R cells overlaps with a decrease in demethylation by Tet3, which presumably results in the silencing of Btk, Was and Plek promoters.

Actin cytoskeleton is poorly organized in resistant erythroleukemia cells

The actin cytoskeleton is composed of an extensive variety of actin regulators and nucleators that interact through a complicated protein network [22, 23]. Our analysis indicated that the expression of a group of genes related to actin cytoskeleton organization was profoundly depressed in the resistant erythroleukemia cell line. To examine whether actin was affected by the silencing of genes related to actin polymerization and/or regulation, we evaluated its protein expression by Western blotting and found that its levels were similar between MEL and MEL-R cells (Fig 8).

290

291 While these results demonstrate that the total amount of actin is equivalent for both cell lines, it
 292 does not reveal details of the actin organization. We therefore used fluorescence
 293 immunocytochemistry and confocal microscopy with an antibody to actin to localize the protein
 294 in fixed MEL and MEL-R cells. In both populations, a rim of actin fluorescence was apparent
 295 surrounding nuclei (Fig 9); however, there was an appreciable reduction in signal intensity in
 296 MEL-R cells. These results were consistent with the RNA-seq analysis, where a marked
 297 reduction in the expression of actin-regulators genes was detected in MEL-R cells, strongly
 298 suggesting that actin cytoskeleton organization is perturbed in the resistant erythroleukemia cell
 299 line. We hypothesized that proteins of the actin network such as Btk, Was and Plek among others
 300 described in Table 1, are essential for such organization although it is unclear whether the
 301 absence of expression is a cause or consequence of the defect.

302

303

304 Discussion

305

306 Cancer cells can acquire resistance to most traditional chemotherapy regimes and also targeted
 307 therapies, and such an occurrence remains a great concern in cancer treatment [24, 25]. Research
 308 on molecular and cellular mechanisms that confer resistance to tumor cells is therefore a major
 309 focus of basic and clinical investigation. Along this line, cell culture models have been crucial to
 310 advance in the understanding of cancer cell resistance. We took advantage of an HMBA-resistant
 311 cell line derived from Friend's erythroleukemia cells, previously established in our lab [9, 10], to
 312 study the molecular events that contribute to the resistant phenotype. Both MEL and MEL-R cell
 313 lines are blocked at the proerythroblast stage of differentiation but unlike the progenitor cell line,
 314 MEL-R cells do not react to HMBA or other chemical inducers (e.g., DMSO, hemin and
 315 butyrate) and remain resistant against cell differentiation. In the present study, we used RNA-seq
 316 technology to identify genes potentially involved in the resistance mechanism. Our analysis
 317 identified 596 genes that were differentially expressed between progenitor and resistant cells,
 318 with the majority corresponding to genes up-regulated in MEL cells while only 110 were up-
 319 regulated in MEL-R cells.

320

Among these identified genes, some of them were conspicuous by their high differential expression between MEL and MEL-R and for sharing two important features: belonging to the actin regulatory network and being preferentially expressed in the hematopoietic lineage. Moreover, many of these genes are specifically activated in hematopoietic lineages and at least three, Was, Btk and Rac2, when mutated are linked to severe human hematological pathologies [16-18]. Additionally, a recent study showed that biallelic mutations in the Dock2 gene results in severe immunodeficiency that leads to defects in actin polymerization [26].

The network of actin filaments provides mechanical support to the cell cytoskeleton, but it is increasingly acknowledged that it also contributes to other critical cellular processes. Emerging evidence points to a role for the actin cytoskeleton in controlling and regulating receptor signaling [27]. We show here a dramatic down-regulation of some of these network components in MEL-R cells, which correlates well with the methylation status at nearby CpG islands in the promoters of Was, Btk and Plek. Over-expression of the methyltransferase Dnmt1, a maintenance methylase that acts on hemimethylated DNA, and the repression of the Tet3 demethylase, support these findings, leading us to speculate that silencing of most of the cytoskeleton-associated proteins is linked to a hypermethylation status. Interestingly, whereas no significant changes in total actin protein levels were observed between MEL and MEL-R cells, a weaker signal was detected in MEL-R cells by immunocytochemistry, which might suggest poor actin organization. Regulation of actin polymerization in eukaryotes requires a large number of accessory proteins that facilitate polymerization or disassembly of monomeric globular actin (G-actin) into filamentous actin (F-actin) and vice versa; many of these proteins interact with each other. For example, Btk interacts with Was and activates the protein by inducing its phosphorylation in B cells [28]. Btk also promotes a Rac2 response, leading to F-actin rearrangements in mast cells [29]. Dock2 is essential for lymphocyte migration and mediates cytoskeletal reorganization through Rac2 activation [30]. The transcription factor PU.1, responsible for the differentiation block in MEL cells but silenced in MEL-R cells, is a major regulator of Btk expression both in myeloid and lymphoid cells [31, 32]. In summary, the actin cytoskeleton network is orchestrated through multiple associated proteins probably with overlapping roles, which contribute to different cell functions through complex associations. As

we showed here, silencing of some of these proteins has deleterious effects on actin organization and we hazard that this might be a cause for the blockade of differentiation in resistant cells.

As stated earlier, only 110 from 596 differentially-expressed genes were up-regulated in MEL-R cells. This indicates a tendency towards a general shut-down of gene expression in resistant cells, a situation comparable with what occurs during cell differentiation. Silenced compartments composed mainly of heterochromatin are considered hallmarks of the differentiated cells, a condition that progresses all through terminal differentiation (reviewed in [33]. A gradual increase in heterochromatinization has been described in differentiating leukemia cells, as measured by the amount of the heterochromatin-associated HP1a, which increases continuously during MEL terminal differentiation [34]. Heterochromatinization is enhanced in MEL-R cells relative to undifferentiated MEL cells, but is nevertheless lower than in HMBA-differentiated cells (unpublished results). The progressive gene silencing observed in MEL-R cells is one additional element that suggests that these cells are at a midway point between the undifferentiated and differentiated phenotypes due to a block somewhere in the process. Concomitant with this genetic blackout, histone genes emerge as the major group up-regulated in the resistant phenotype. Initially, we associated the histone gene expression pattern with the tetraploid status of the MEL-R cell lines. Polyploidy has been reported in tumor cells as a result of stress-induced endoreplication [35, 36]. Chronic HMBA treatment might represent a hard-hitting stress that MEL-R cells overcome via a survival phenotype, i.e. tetraploidization, increased cell size and impaired cell differentiation. Coward and Harding in a comprehensive perspective support the hypothesis that tetraploidy provides numerous advantages during tumor initiation. [37]. Moreover, they present data sustaining that polyploid facilitates the acquisition of therapy-resistance in multiple cancers. MEL-R tetraploidy may possibly involve chromatin rearrangements and consequently histone gene expression changes. Nevertheless, the same fluctuations in histone gene expression were observed in differentiated cells, indicating that differentiated and resistant cells share a common mechanism. In vivo, the quantity of reticulocytes, a stage comparable to the last stages of HMBA-induced differentiation, increases several fold in a very short time [38], and it is speculated that a large amount of histones needs to be generated. Recently, it was shown that when reticulocytes mature and before enucleation, major histones are released into the cytoplasm from an unexpected nuclear opening during

terminal erythropoiesis, a migration that is crucial for chromatin condensation and terminal differentiation [39]. We speculate that as an increase in histones occur both in HMBA-differentiated MEL and in MEL-R cells, a failure in chromatin condensation, either by an impairment in histone release or by a yet unknown mechanism, might interfere with terminal cell differentiation in resistant cells.

Acknowledgements

We acknowledge María-José Fernández Nestosa for her suggestions and critical reading of the manuscript and Alicia Bernabé for technical help. We are grateful to Mario García and his team from the Bioinformatics and Biostatistics Facility at the CIB for their efficient and dedicated technical support for the Next Generation Sequencing data analysis.

References

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- [3] Nowak D, Stewart D, Koeffler HP. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood*. 2009 Apr 16;113(16):3655-65.
- [4] Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 10;27(32):5459-68.
- [5] Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):562-9.
- [6] Haouala A, Widmer N, Duchosal MA, Montemurro M, Buclin T, Decosterd LA. Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):e75-87.
- [7] Iland HJ, Bradstock K, Supple SG, Catalano A, Collins M, Hertzberg M, et al. All-trans-retinoic acid, idarubicin, and IV arsenic trioxide as initial therapy in acute promyelocytic leukemia (APML4). *Blood*. 2012 Aug 23;120(8):1570-80; quiz 752.
- [8] Friend C, Scher W, Holland JG, Sato T. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Feb;68(2):378-82.

- 419 [9] Fernandez-Nestosa MJ, Hernandez P, Schwartzman JB, Krimer DB. PU.1 is dispensable
420 to block erythroid differentiation in Friend erythroleukemia cells. *Leuk Res.* 2008 Jan;32(1):121-
421 30.
- 422 [10] Fernandez-Nestosa MJ, Monturus E, Sanchez Z, Torres FS, Fernandez AF, Fraga MF, et
423 al. DNA methylation-mediated silencing of PU.1 in leukemia cells resistant to cell
424 differentiation. *Springerplus.* 2013;2:392.
- 425 [11] Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and
426 transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc.*
427 2012 Mar;7(3):562-78.
- 428 [12] Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--
429 new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug;40(15):e115.
- 430 [13] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T)
431 method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
- 432 [14] Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.*
433 2002 Nov;18(11):1427-31.
- 434 [15] Anders S, Reyes A, Huber W. Detecting differential usage of exons from RNA-seq data.
435 *Genome Res.* 2012 Oct;22(10):2008-17.
- 436 [16] Ambruso DR, Knall C, Abell AN, Panepinto J, Kurkchubasche A, Thurman G, et al.
437 Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation.
438 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 25;97(9):4654-9.
- 439 [17] Bosticardo M, Marangoni F, Aiuti A, Villa A, Grazia Roncarolo M. Recent advances in
440 understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood.* 2009 Jun
441 18;113(25):6288-95.
- 442 [18] Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, Paris K, Grigoriadou S, et al. Primary B
443 cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:199-227.
- 444 [19] Schmidt U, van den Akker E, Parren-van Amelsvoort M, Litos G, de Bruijn M, Gutierrez
445 L, et al. Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled
446 protection against TRAIL in erythroid progenitors. *J Exp Med.* 2004 Mar 15;199(6):785-95.
- 447 [20] Kiyokawa H, Richon VM, Venta-Perez G, Rifkind RA, Marks PA.
448 Hexamethylenebisacetamide-induced erythroleukemia cell differentiation involves modulation of
449 events required for cell cycle progression through G1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul
450 15;90(14):6746-50.
- 451 [21] Vanegas N, Garcia-Sacristan A, Lopez-Fernandez LA, Parraga M, del Mazo J,
452 Hernandez P, et al. Differential expression of Ran GTPase during HMBA-induced differentiation
453 in murine erythroleukemia cells. *Leuk Res.* 2003 Jul;27(7):607-15.
- 454 [22] Bezanilla M, Gladfelter AS, Kovar DR, Lee WL. Cytoskeletal dynamics: a view from the
455 membrane. *J Cell Biol.* 2015 May 11;209(3):329-37.
- 456 [23] Moulding DA, Record J, Malinova D, Thrasher AJ. Actin cytoskeletal defects in
457 immunodeficiency. *Immunol Rev.* 2013 Nov;256(1):282-99.
- 458 [24] Rebucci M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy.
459 *Biochem Pharmacol.* 2013 May 1;85(9):1219-26.
- 460 [25] Raguz S, Yague E. Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into
461 an old problem. *Br J Cancer.* 2008 Aug 5;99(3):387-91.
- 462 [26] Dobbs K, Dominguez Conde C, Zhang SY, Parolini S, Audry M, Chou J, et al. Inherited
463 DOCK2 Deficiency in Patients with Early-Onset Invasive Infections. *N Engl J Med.* 2015 Jun
464 18;372(25):2409-22.

- [27] Mattila PK, Batista FD, Treanor B. Dynamics of the actin cytoskeleton mediates receptor cross talk: An emerging concept in tuning receptor signaling. *J Cell Biol.* 2016 Feb 1;212(3):267-80.
- [28] Sharma S, Orlowski G, Song W. Btk regulates B cell receptor-mediated antigen processing and presentation by controlling actin cytoskeleton dynamics in B cells. *J Immunol.* 2009 Jan 1;182(1):329-39.
- [29] Kuehn HS, Radinger M, Brown JM, Ali K, Vanhaesebroeck B, Beaven MA, et al. Btk-dependent Rac activation and actin rearrangement following FcepsilonRI aggregation promotes enhanced chemotactic responses of mast cells. *J Cell Sci.* 2010 Aug 1;123(Pt 15):2576-85.
- [30] Fukui Y, Hashimoto O, Sanui T, Oono T, Koga H, Abe M, et al. Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature.* 2001 Aug 23;412(6849):826-31.
- [31] Christie DA, Xu LS, Turkistany SA, Solomon LA, Li SK, Yim E, et al. PU.1 opposes IL-7-dependent proliferation of developing B cells with involvement of the direct target gene bruton tyrosine kinase. *J Immunol.* 2015 Jan 15;194(2):595-605.
- [32] Himmelmann A, Thevenin C, Harrison K, Kehrl JH. Analysis of the Bruton's tyrosine kinase gene promoter reveals critical PU.1 and SP1 sites. *Blood.* 1996 Feb 1;87(3):1036-44.
- [33] Politz JC, Scalzo D, Groudine M. Something silent this way forms: the functional organization of the repressive nuclear compartment. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013;29:241-70.
- [34] Estefania MM, Ganier O, Hernandez P, Schvartzman JB, Mechali M, Krimer DB. DNA replication fading as proliferating cells advance in their commitment to terminal differentiation. *Sci Rep.* 2012;2:279.
- [35] Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev.* 2009 Nov 1;23(21):2461-77.
- [36] Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Jan;5(1):45-54.
- [37] Coward J, Harding A. Size does matter: why polyploid tumor cells are critical drug targets in the war on cancer. *Front Oncol.* 2014;4:123.
- [38] Ji P, Jayapal SR, Lodish HF. Enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts requires Rac GTPases and mDia2. *Nat Cell Biol.* 2008 Mar;10(3):314-21.
- [39] Zhao B, Mei Y, Schipma MJ, Roth EW, Bleher R, Rappoport JZ, et al. Nuclear Condensation during Mouse Erythropoiesis Requires Caspase-3-Mediated Nuclear Opening. *Dev Cell.* 2016 Mar 7;36(5):498-510.
- [40] Ward J, Jr. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association.* 1963;8(301):236-44.

Figure 1(on next page)

Differentially expressed transcripts between parental MEL-DS19 (MEL) and HMBA-resistant (MEL-R) cell lines identified by RNA-seq.

Differentially expressed genes were plotted according to fold changes represented by the FPKM ratio in a logarithmical scale. In total, 486 up-regulated genes were identified in the parental line (FPKM MEL > FPKM MEL-R) whereas 110 were up-regulated in the resistant cells (FPKM MEL < FPKM MEL-R). A two-fold change cutoff was applied in both cases reflected by the discontinuity of the curve.

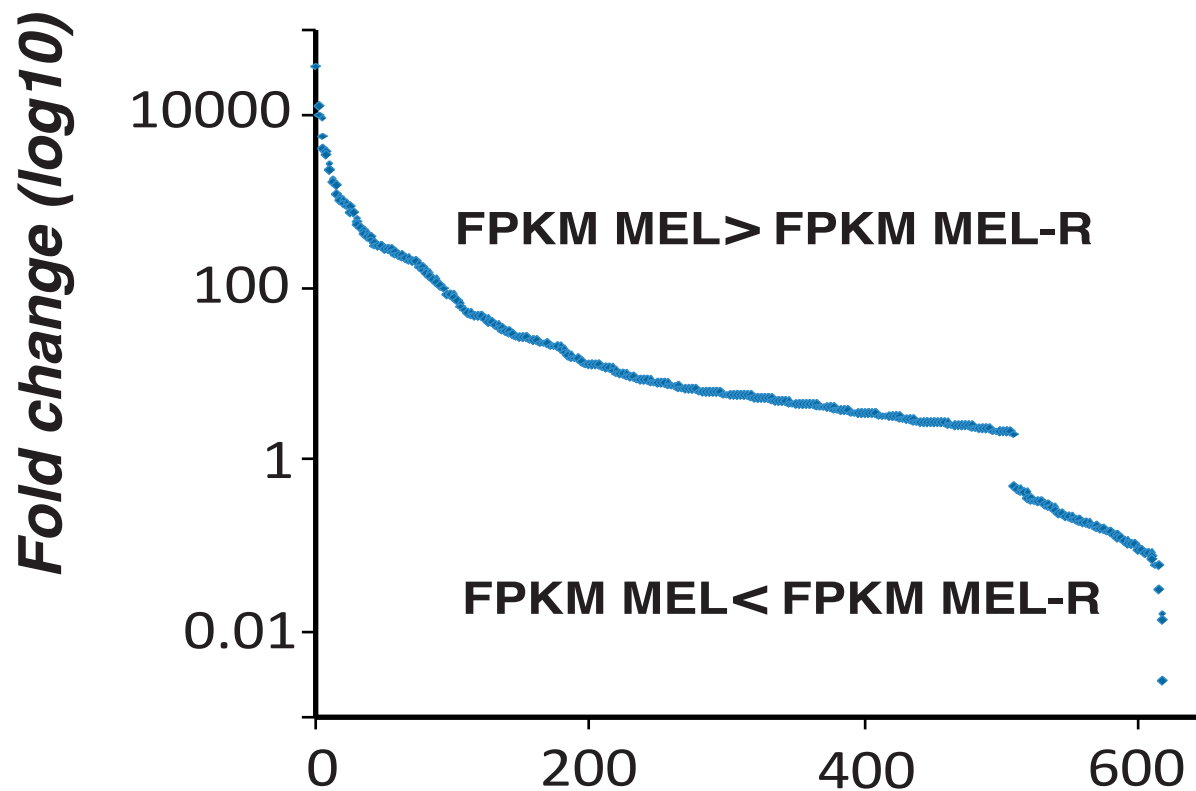


Fig. 1

Figure 2(on next page)

Expression differences between MEL and MEL-R cell lines.

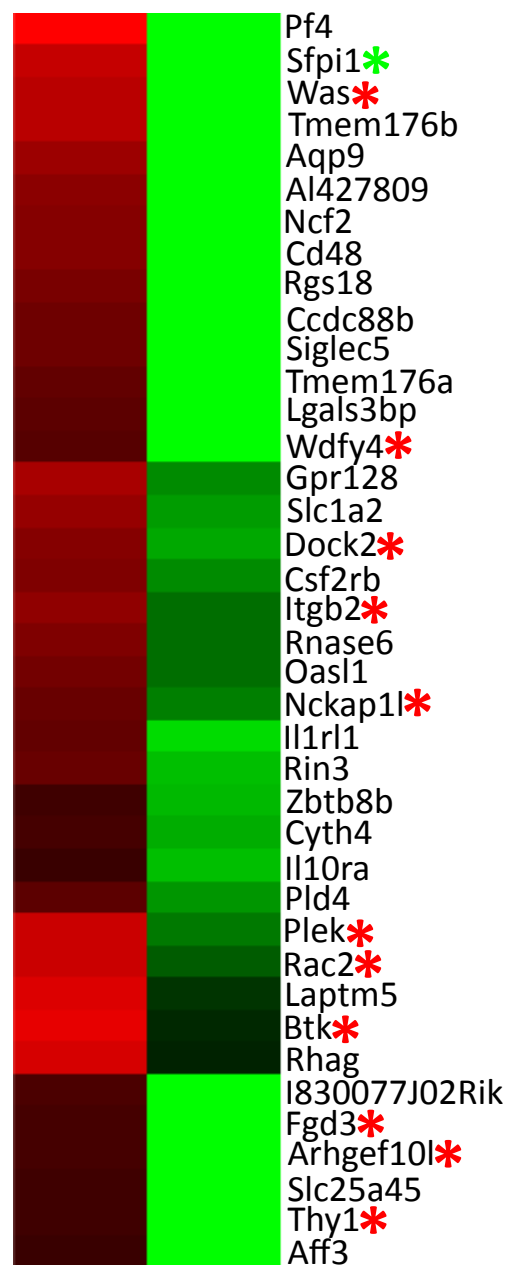
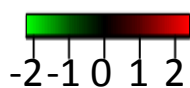
A) Cluster analysis of differentially expressed genes between MEL and MEL-R cell lines classified based on analysis of minimum variance [40] . B) Heat map zoomed to amplify the genes with higher fold-change values. Genes related to the actin cytoskeletal network are indicated by red asterisks. As expected, PU.1/Sfpi presented strong differences in expression towards the progenitor cells and served as control for RNA-seq efficiency (green asterisk). C) Heat map limited to histone gene expression,. Red and green colors represent high and low expression, respectively, for all the panels.

A



MEL
MEL-R

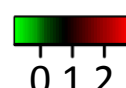
B



MEL
MEL-R

Pf4
Sfpi1*
Was*
Tmem176b
Aqp9
Al427809
Ncf2
Cd48
Rgs18
Ccadc88b
Siglec5
Tmem176a
Lgals3bp
Wdfy4*
Gpr128
Slc1a2
Dock2*
Csf2rb
Itgb2*
Rnase6
Oasl1
Nckap1*
Il1rl1
Rin3
Zbtb8b
Cyth4
Il10ra
Pld4
Plek*
Rac2*
Laptm5
Btk*
Rhag
I830077J02Rik
Fgd3*
Arhgef10*
Slc25a45
Thy1*
Aff3

C



MEL
MEL-R

H2afx
H1f0
H3f3b
Hist1h2bc
Hist1h1c
Hist2h2be
Hist1h2bj
Hist1h2bg
Hist2h2aa2
Hist1h2bn
Hist1h2bl
Hist1h2bk
Hist2h2aa1
Hist2h3c2
Hist1h2ba
Hist1h2bp
Hist3h2a
Hist1h1d

Figure 3(on next page)

Tetraploidy characterizes HMBA-resistant cells.

DNA content assayed by propidium iodide (PI) staining and flow cytometry show that HMBA-induced differentiated MEL cells (MEL-96h) accumulate in G1 as compared with the uninduced cell line (MEL-0h). DNA profile of HMBA-resistant cells (MEL-R) is similar to that observed in uninduced MEL cells regarding the fractions of cells in G1, S and G2-M. However, the DNA content profile is shifted to the right of the panel confirming that those cells become tetraploid.

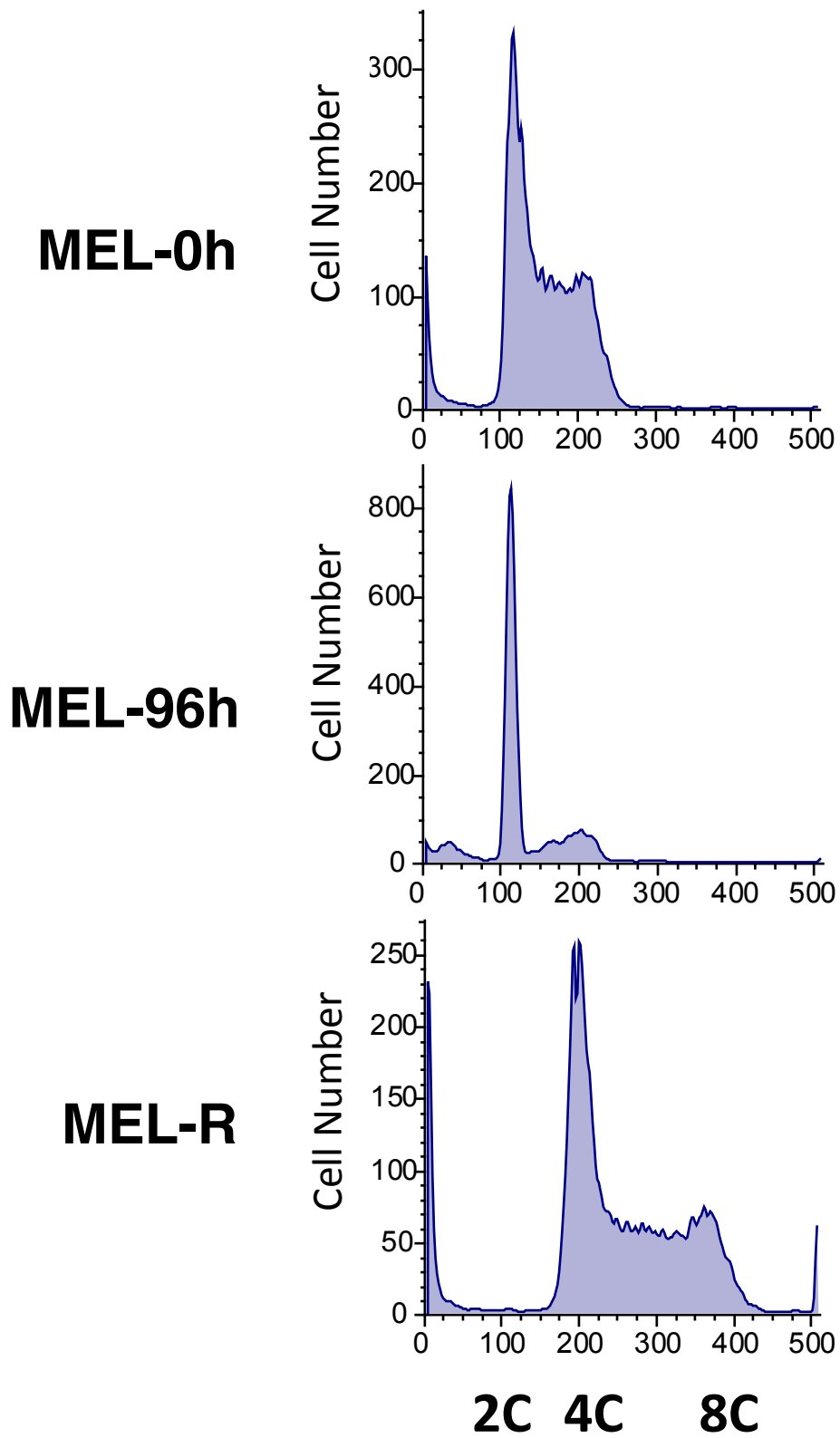


Fig. 3

Figure 4 (on next page)

Validation of differentially regulated genes associated with the actin cytoskeletal network by qRT-PCR.

Selected genes that exhibited the highest FPKM values between MEL and MEL-R cell lines by RNA-seq were chosen for further validation by qRT-PCR. For the progenitor cell line, samples treated with HMBA for 96 h were also included. Data were normalized to b-actin expression for each sample. Bars represent \pm SD of triplicate determinations.

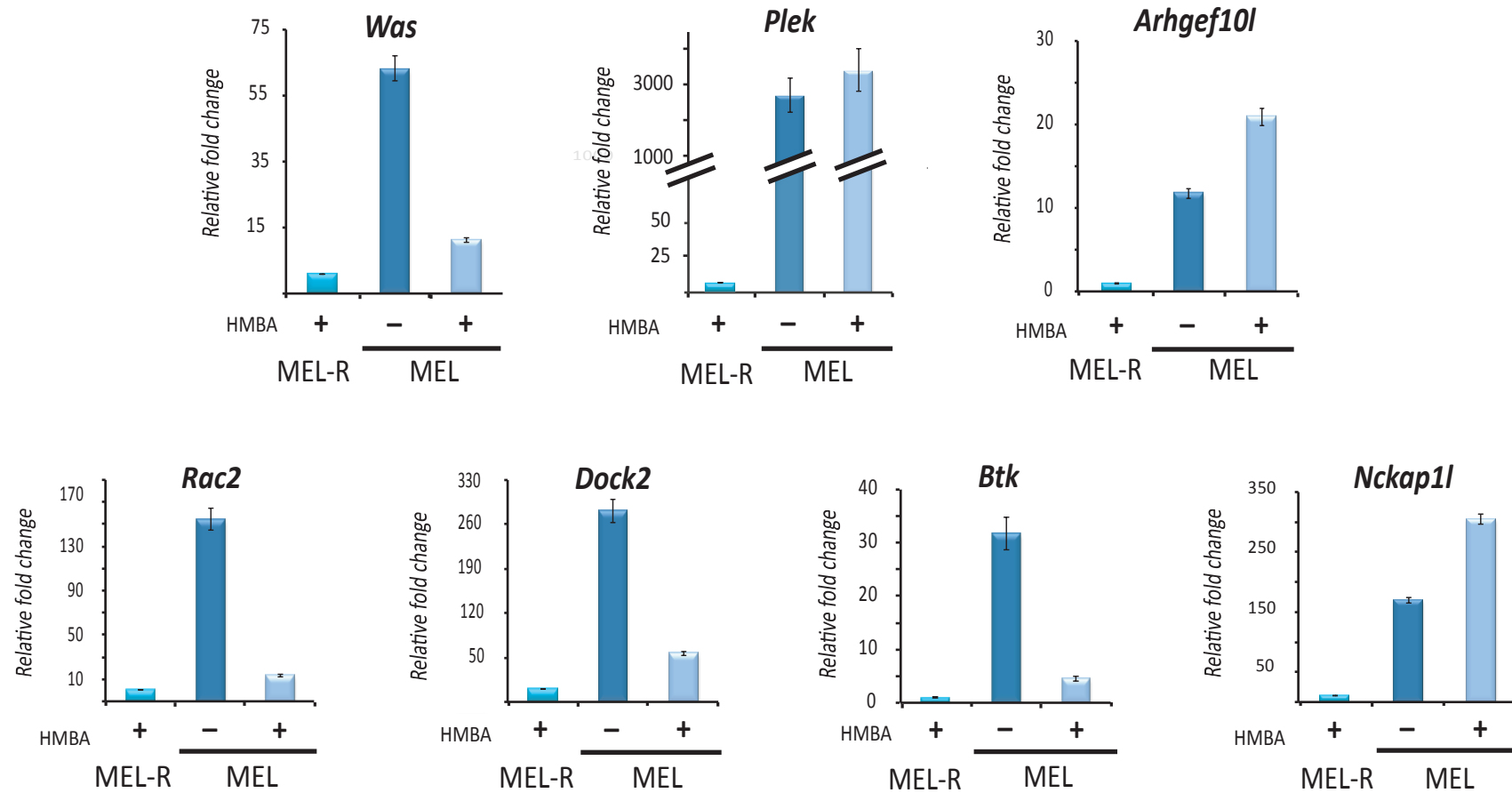


Fig. 4

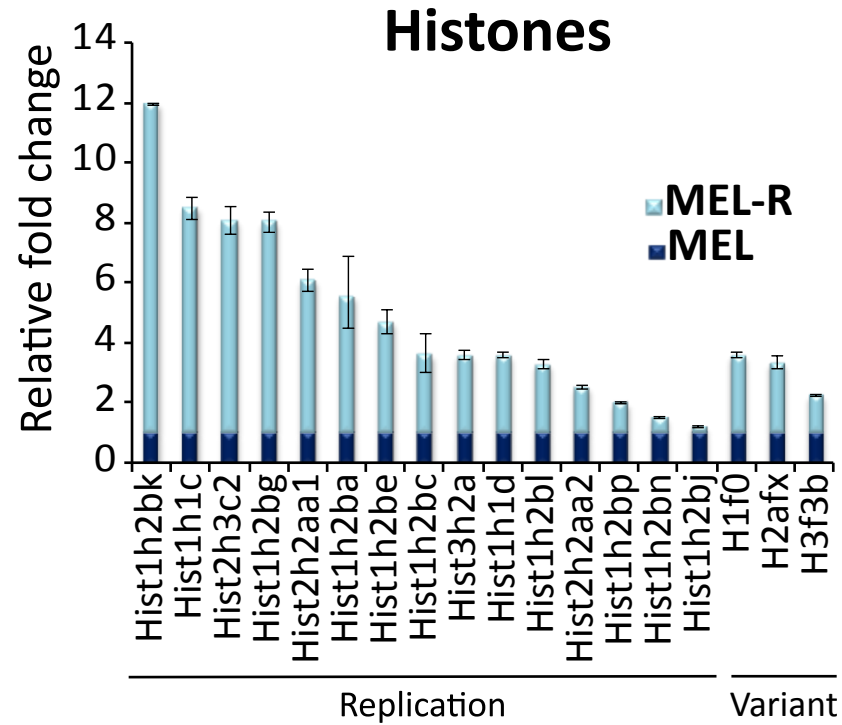
Figure 5(on next page)

Differential histone gene expression between progenitor and resistant cell lines and after differentiation.

qRT-PCR analysis of histone genes, canonical and variant, up-regulated in MEL-R cells relative to MEL cells, and B) in HMBA-induced MEL cells (MEL 96h) relative to uninduced cells (MEL).

Data were normalized to b-actin expression for each sample. Bars represent \pm SD of triplicate determinations

A



B

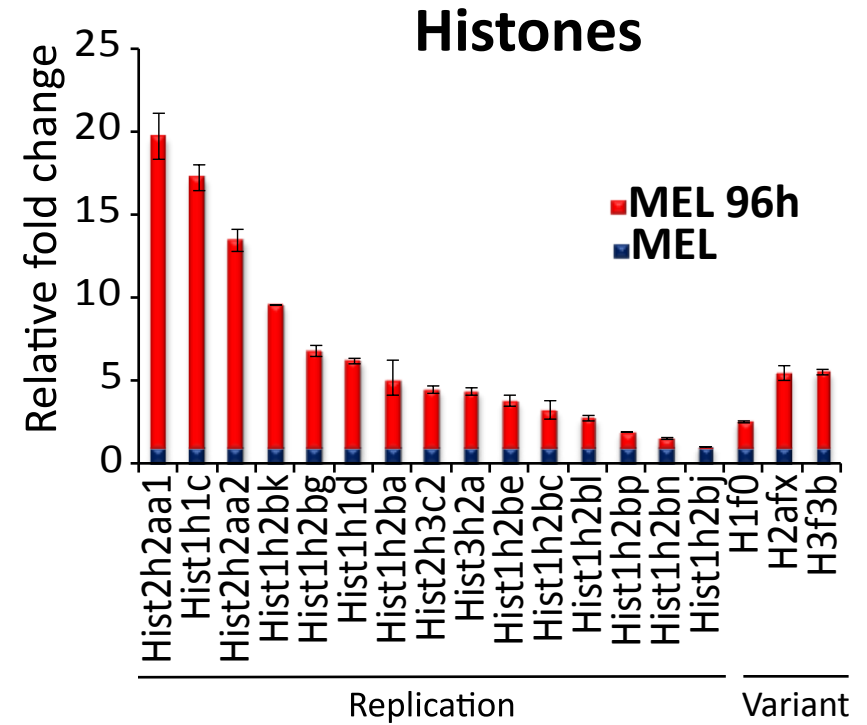


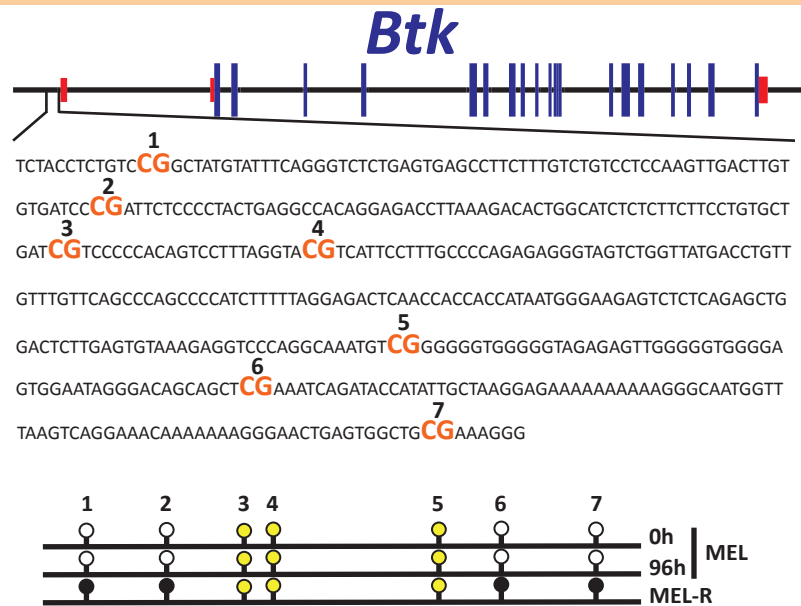
Fig. 5

Figure 6 (on next page)

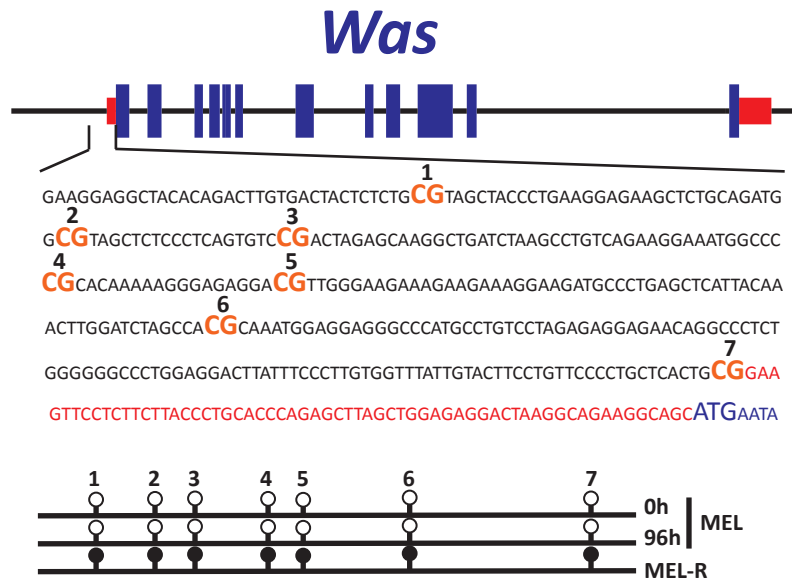
Methylation status of the Btk, Was and Plek promoters at the HMBA-resistant cells.

Genomic maps including exons (blue rectangles) and 5' and 3' UTRs (red rectangles) of A) Btk, B) Was and C) Plek. Expanded regions illustrate the promoter regions containing seven CpG islands (CG) for Btk and Was and five CpG islands for Plek. "Lollipop" schematic diagram of methylation patterns is represented below each sequence. Results from untreated (0h) or HMBA-treated MEL cells (96 h) as well as MEL-R cells are shown. Black and white lollipops indicate methylated or unmethylated CpGs, respectively, while undetermined methylation status (see text for details) is represented in yellow.

A



B



C

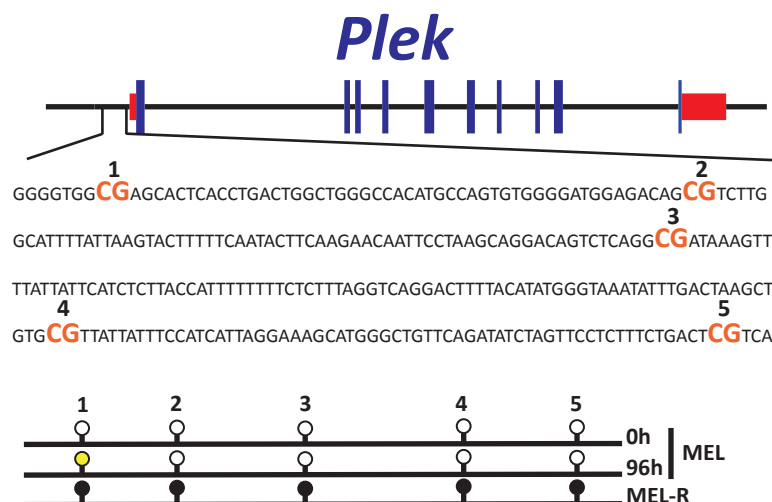


Fig. 6

Figure 7 (on next page)

High and low expression of Dnmt1 and Tet3, respectively, correlate well with gene silencing and DNA methylation in MEL-R cells.

qRT-PCR was performed for Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b methylases and Tet1, Tet2 and Tet3 demethylases in undifferentiated, HMBA-treated MEL cells and in MEL-R cells. Data were normalized to b-actin expression for each sample. Bars represent \pm SD of triplicate determinations.

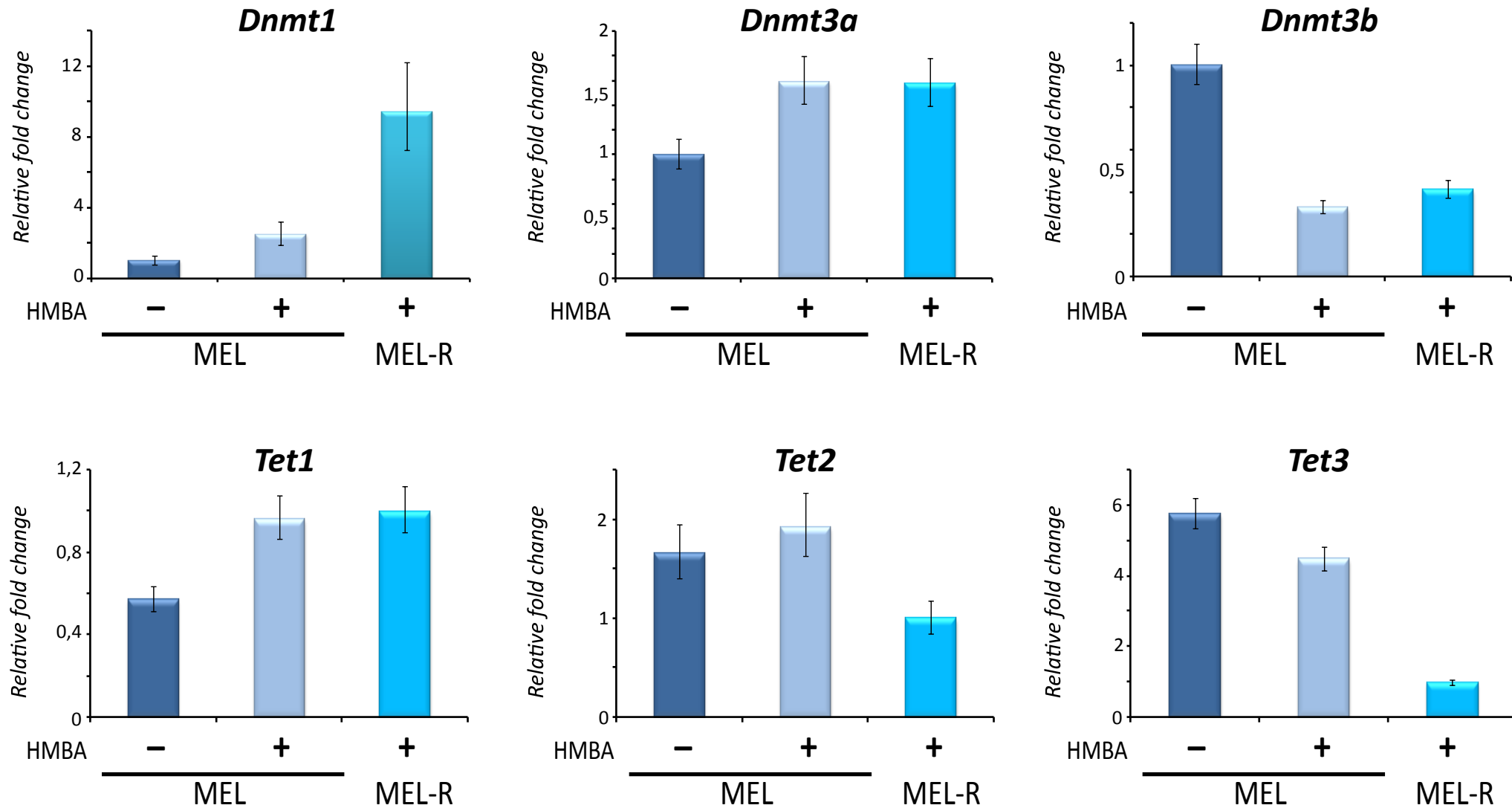


Fig. 7

Figure 8(on next page)

Actin protein is equally abundant in progenitor and resistant MEL cells.

Western blot analysis for actin protein expression in MEL and MEL-R leukemia cells and in 3T3 control fibroblasts. Equal amounts of protein were loaded and immunoblotted with an anti-b-actin antibody. Anti a-tubulin was used as a loading control.

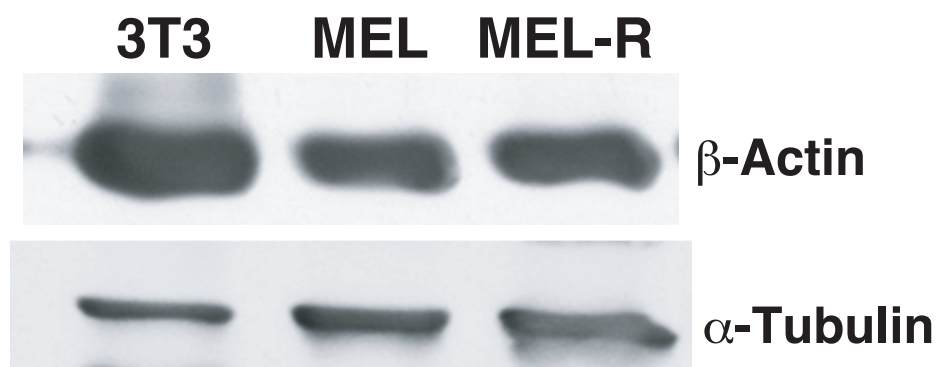


Fig. 8

Figure 9(on next page)

Actin cytoskeleton integrity is perturbed in MEL-resistant cell lines.

Confocal immunofluorescence microscopy of progenitor MEL cells and resistant MEL-R cells stained with a mouse monoclonal anti-b-actin antibody (red). Nuclear DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar is 10 mm.

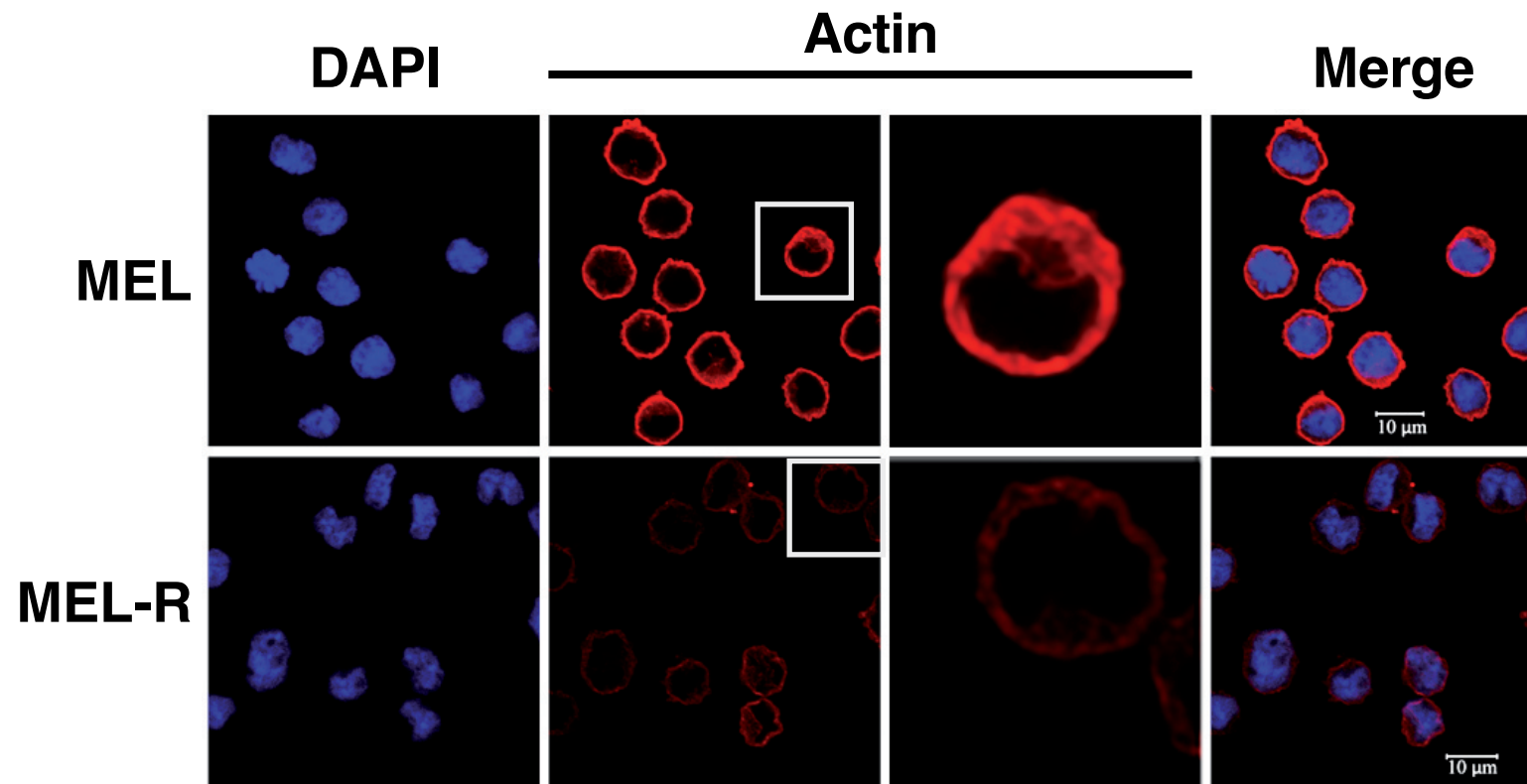


Fig. 9

Table 1(on next page)

List of differentially expressed genes related to actin cytoskeleton

List of differentially expressed genes related to actin cytoskeleton

Table 1. List of differentially expressed genes related to actin cytoskeleton

Gene	Locus	FPKM_MELR	FPKM_MEL	Log2 (Fold Change)
*Was	X:7658591-7667617	0.00631327	65.48	13.3403792
Wdfy4	14:33772732-33998252	0.00631327	9.78436	10.5978743
*Plek	11:16871208-16908721	0.0599941	90.8539	10.5645121
Fgd3	13:49358478-49404577	0.00631327	6.88043	10.0898956
*Arhgef10l	4:140070399-140221820	0.00631327	6.2823	9.95868967
*Rac2	15:78389598-78403213	0.0930802	91.0001	9.9331781
Thy1	9:43851466-43856662	0.00631327	5.54603	9.77885225
*Dock2	11:34126863-34414545	0.0272059	23.2087	9.73653044
*Btk	X:131076879-131117679	0.358226	148.999	8.70021688
Itgb2	10:76993092-77028419	0.0698373	27.2361	8.60730664
*Nckap1l	15:103284255-103329231	0.0550022	13.9085	7.9822618